

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
25 janvier 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 01/05422 A2

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: A61K 38/17

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/02057

(22) Date de dépôt international: 17 juillet 2000 (17.07.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:  
99/09372 15 juillet 1999 (15.07.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US):  
BIOMERIEUX STELHYS [FR/FR]; Chemin de  
L'Orme, F-69280 Marcy L'Etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): ROECK-  
LIN, Dominique [FR/FR]; 14 Rue de la Paix, F-67500  
Niederschaeffolsheim (FR). KOLBE, Hanno [FR/FR]; 6

Rue des Tuiliers, F-67204 Achenheim (FR). CHARLES,  
Marie-Hélène [FR/FR]; 3 Allée de la Lamperte, F-69420  
Condrieu (FR). MALCUS, Carine [FR/FR]; 9 Rue des  
Ronzières, F-69530 Brignais (FR). SANTORO, Lyse  
[FR/FR]; 47 Avenue Bergeron, F-69260 Charbonnières les  
Bains (FR). PERRON, Hervé [FR/FR]; 15 Rue de Boyer,  
F-69005 Lyon (FR).

(74) Mandataire: DIDIER, Mireille; Cabinet Germain et  
Maureau, Boîte Postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06  
(FR).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: USE OF A POLYPEPTIDE FOR DETECTING, PREVENTING OR TREATING A PATHOLOGICAL CONDITION  
ASSOCIATED WITH A DEGENERATIVE, NEUROLOGICAL OR AUTOIMMUNE DISEASE

(54) Titre: UTILISATION D'UN POLYPEPTIQUE POUR DETECTER, PREVENIR OU TRAITER UN ETAT PATHOLOGIQUE  
ASSOCIE A UNE MALADIE DEGENERATIVE, NEUROLOGIQUE AUTOIMMUNE

(57) Abstract: The invention concerns the use of at least one polypeptide comprising a protein fragment to obtain a diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic composition for detecting, preventing or treating a pathological condition associated with a degenerative and/or neurological and/or autoimmune disease, said protein being selected among the proteins whereof the peptide sequence in native state corresponds to SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 9, SEQ ID No 10, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12, SEQ ID No 13, SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 19, SEQ ID No 20, SEQ ID No 21, SEQ ID No 22, SEQ ID No 23, SEQ ID No 24, SEQ ID No 25, SEQ ID No 26, SEQ ID No 27, SEQ ID No 28 and SEQ ID No 29, and the peptide sequences having at least 70 % identity, preferably at least 80 % identity and advantageously at least 98 % identity with any one of the peptide sequences SEQ ID No 1 to SEQ ID No 8 and SEQ ID No 10 to SEQ ID No 29, and the peptide sequences or fragments of said sequences belonging to a common family of proteins selected among perlecan, the precursor of the retinol-binding plasmatc protein, of the precursor of the activator of GM2 ganglioside, of calgranulin B and of saponin B.

(57) Abrégé: Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

WO 01/05422 A2



MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

**Publiée:**

- *Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.*

**UTILISATION DUN POLYPEPTIDE POUR DETECTER, PREVENIR OU  
TRAITER UN ETAT PATHOLOGIQUE ASSOCIE A UNE MALADIE  
DEGENERATIVE, NEUROLOGIQUE AUTOIMMUNE**

5           La présente invention concerne notamment l'utilisation d'au moins un polypeptide, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune et/ou neurologique.

          Selon l'invention, on entend par maladie dégénérative, une maladie dans  
10 laquelle un processus de mort cellulaire ou de destruction cellulaire est associé à des troubles physiologiques et/ou cliniques. La maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Parkinson sont classées parmi les maladies neurodégénératives. On entend par maladie auto-immune, une hyperréactivité du système immunitaire vis à vis d'un ou de plusieurs auto-antigène(s). La sclérose en  
15 plaques (SEP), la polyarthrite rhumatoïde (PR) et le lupus érythémateux sont classés dans les maladies auto-immunes.

          La sclérose en plaques est une maladie chronique du système nerveux central de l'homme, évoluant par succession de phases de rémission et de poussée ou selon une progression régulière, dont la caractéristique anatomopathologique consiste  
20 en la formation de zones de démyélinisation bien délimitées dans la substance blanche du cerveau et de la moelle épinière.

          Au niveau histologique, ces zones présentent au stade précoce du processus lésionnel, une dégradation de la myéline péri-axonale associée à une atteinte des cellules gliales responsable de cette démyélinisation. Une activation  
25 macrophagique inflammatoire impliquant les cellules microgliales (macrophages tissulaires résidants du système nerveux central), ainsi que, probablement, des macrophages provenant de monocytes sanguins infiltrés, est associée à ce processus de démyélinisation et contribue à la destruction des feuillets myélinisés. Au centre de la zone démyélinisée, une déplétion relative en cellules gliales est retrouvée alors qu'une  
30 prolifération d'astrocytes se développe à la périphérie et peut envahir la plaque démyélinisée pour générer une plaque fibreuse ou gliotique. Ces structures sclérotiques sont à l'origine du nom donné à la maladie.

Une autre caractéristique de ces plaques est leur association quasi systématique avec un élément vasculaire autour duquel elles se développent.

Au niveau histologique, on observe une altération fréquente de la barrière hémato-encéphalique (BHE) constituée par l'endothélium capillaire. Un des éléments  
5 déterminants dans le maintien de la BHE est constitué par la présence sous-jacente d'extensions cytoplasmiques des astrocytes, appelées pieds astrocytaires. Vraisemblablement, les pieds astrocytaires induisent la formation ou permettent le maintien de structures de jonction étanches qui assurent la cohésion de la barrière endothéliale capillaire concrétisant la BHE. Or, différents modèles pathologiques font  
10 état de l'altération de la BHE et d'une déplétion des pieds astrocytaires.

Par ailleurs, dans le processus lésionnel de la SEP, l'altération de la BHE contribue à amplifier la réponse inflammatoire associée, par l'afflux de cellules lymphoïdes provenant de la circulation sanguine. La contribution de l'inflammation associée aux cellules immunitaires est importante dans la SEP et participe au processus  
15 lésionnel.

L'étiologie de la SEP est source d'un débat d'actualité car la maladie pourrait avoir des origines diverses. Des hypothèses ont été émises sur une origine bactérienne et/ou virale. Par ailleurs, comme décrit dans la demande de brevet WO 95/21859, H. Perron et al. ont été conduits à rechercher un ou des agents effecteurs  
20 du processus pathogénique aboutissant à la formation typique de plaques de démyélinisation et à une gliose astrocytaire. Dans le cadre de cette étude, ils ont mis en évidence la présence dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le sérum de patients SEP d'au moins un facteur qui présente une activité toxique vis à vis des cellules astrocytaires et oligodendrocytaires humaines ou animales. Cette activité toxique se  
25 caractérise par une désorganisation cytomorphologique du réseau de filaments intermédiaires et/ou une dégradation des protéines desdits filaments et/ou une mort cellulaires par apoptose des cellules gliales. Ils ont établi une corrélation significative entre la détection *in vitro* de cette activité toxique dans des échantillons de LCR et de sérum de patients SEP et la sclérose en plaques par un dosage colorimétrique  
30 quantitatif au bromure de méthyltétrazolium (MTT) des cellules vivantes, comme décrit dans la demande de brevet WO 95/21859. Par ailleurs, C. Malcus-Vocanson *et al.* ont montré que l'urine est un fluide biologique très favorable pour la détection de



l'activité de ce facteur toxique et développé un procédé utilisant la cytométrie de flux pour détecter et/ou quantifier les cellules gliales adhérentes mortes par apoptose. Toutes les informations concernant ce procédé sont décrites dans la demande de brevet WO 98/11439, dont le contenu est incorporé à titre de référence.

5 Des essais ont été réalisés à partir d'une fraction protéique de LCR et d'urine de patients SEP pour tenter d'identifier ce facteur toxique. Le contenu protéique de chaque fraction a été séparé sur gel SDS-PAGE 12 % et observé après coloration du gel à l'argent. Parmi les protéines observées, une fraction protéique centrée sur un poids moléculaire apparent d'environ 21 kD a été trouvée  
10 minoritairement associée à l'activité toxique détectée *in vitro* et une fraction centrée sur un poids moléculaire apparent d'environ 17 kD a été trouvée majoritairement associée à cette activité toxique.

Une injection de la fraction provenant de LCR de patients SEP dans le cerveau de rat Lewis et une observation histologique post-mortem de coupes de  
15 cerveau des rats a permis d'observer, trois mois après l'injection, une apoptose de la population astrocytaire et la formation de plaques de démyélinisation. Toutes les informations sont contenues dans la demande de brevet WO 97/33466, dont le contenu est incorporé à titre de référence. Ces observations sont conformes à celles qui ont pu être faites sur des coupes de cerveau de patients atteints de SEP, après biopsie (N.  
20 Benjelloun et al. Cell. Mol. Biol., 1998, 44 (4), 579-583).

Les présents inventeurs ont maintenant identifié et analysé les protéines associées à cette activité toxique vis à vis des cellules gliales dans des échantillons biologiques de patients SEP, en particulier dans l'urine, le liquide céphalo-rachidien et le sérum.

25 Après purification des protéines et séparation sur gel SDS-TRICINE, les inventeurs ont mis en évidence la présence de quatre bandes d'intérêt de différents poids moléculaires apparents, respectivement de 8, 14, 18 et 20 kD correspondant à au moins cinq familles de protéines différentes. Les protéines de ces familles ont ensuite été analysées par spectrométrie de masse et/ou séquençage et recherche d'homologie  
30 dans les banques de données (NCBI [http :/www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), Basic Blast Search, Protein Blastp, les séquences protéiques sont entrées en format FASTA dans la base de données nr, l'algorithme utilisé est Matrix BLOSUM62, l'identité dénommée

“ Identities ” correspond au nombre d’acides aminés identiques donné en pourcentage et la positivité “ Positives ” correspond aux acides aminés présentant une équivalence biologique selon les paramètres susmentionnés du logiciel donnés en pourcentage). Ces protéines appartiennent aux familles des protéines du Perlecan, du précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol, du précurseur de l’activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline et de la saposine B. Plus précisément, les protéines sont (i) pour la bande de 20 kD le fragment C-terminal du Perlecan qui commence à l’acide aminé 3464 et se termine à l’acide aminé 3707 (Murdoch AD et al. J Biol Chem, 1992, April 25 ;267 (12) :8544-47), et référencé dans l’identificateur de séquences SEQ ID N° 2 (la protéine entière Perlecan étant référencée en SEQ ID N°1), (ii) pour la bande de 20 kD le précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol (Monaco HL et al., Science, 1995, 268 (5213) :1039-1041) dont la séquence est donnée en SEQ ID N° 4, (iii) pour la bande de 18 kD le précurseur de l’activateur du ganglioside GM2 (Furst W et al., Euro J Biochem, 1990, Sep 24 ; 193(3) :709-14) identifié en SEQ ID N° 8, (iv) pour la bande de 14 kD la calgranuline B (Lagasse E et al., Mol Cell Biol, 1988, Jun ;8(6) :2402-10) identifiée en SEQ ID N° 17 et (v) pour la bande de 8 kD la saposine B (Kleinschmidt T et al., Biol Chem Hoppe Seyler, 1988, Dec ;369(12) :1361-5) représentée en SEQ ID N° 24. Ils ont par ailleurs mis également en évidence la présence de séquences variantes auxdites séquences de référence, en particulier pour la bande de 18 kD une séquence variante du précurseur de l’activateur du ganglioside GM2 référencée SEQ ID N° 9. Ces séquences protéiques variantes sont le produit de mutations au niveau des gènes codant pour lesdites protéines ou sont le résultats de phénomènes d’épissage. Il est à noter par exemple que la calprotectine est un variant de la calgranuline B.

Le fragment C-terminal de la protéine Perlecan (SEQ ID N° 2) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 69, en tenant compte du code génétique. La protéine précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol (SEQ ID N° 4) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 70, en tenant compte du code génétique. La protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 31, en tenant compte du code génétique. Les peptides FSWDNCFEGK DPAVIR et YSLPKSEFAV PDLELP issus du polypeptide muté activateur du GM2 (SEQ ID N°9) sont codés par les

séquences nucléotidiques ADN SEQ ID N° 66 et SEQ ID N° 67 respectivement, en tenant compte du code génétique. La protéine calgranuline B (SEQ ID N° 17) est codée par exemple par la séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 42, en tenant compte du code génétique. La protéine saposine B (SEQ ID N° 24) est codée par exemple par la  
5 séquence nucléotidique ADN SEQ ID N° 53, en tenant compte du code génétique.

Par famille de protéines on entend l'ensemble des protéines codées à partir d'un même gène d'ADN et qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent. Le gène ADN est transcrit avec des phénomènes d'épissage alternatif ce qui conduit à la traduction de différentes séquences primaires  
10 de protéines. Toutes ces protéines appartiennent à une même famille protéique. On inclut également dans le terme " famille protéique ", les protéines qui présentent au moins 70% d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec une séquence protéique de référence de la famille.

On entend par multi-épissage, un épissage intervenant au moins une fois  
15 dans la région nucléotidique d'intérêt.

Par exemple, par famille de protéine précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragment de protéines de séquence SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, et les protéines codées par le gène correspondant selon différents  
20 cadres de lecture.

Par exemple, par famille de protéine activatrice du GM2, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragments de protéines de séquence SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, et les protéines codées  
25 par le gène correspondant selon différents cadres de lecture, qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.:

Par exemple, par famille de protéine calgranuline B, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragments de protéines de séquence SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID  
30 N° 22, SEQ ID N° 23, et les protéines codées par le gène correspondant selon différents cadres de lecture, qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent. Les protéines MRP14 (SEQ ID N° 17) et MRP8 (SEQ ID N°

18) ont une séquence protéique différente tout en étant codées par un même gène ; elles appartiennent à la même famille protéique.

Par exemple, par famille de protéine saposine B, on désigne la famille de protéines comprenant *au moins* les protéines ou fragments de protéines de séquence  
5 SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 29, et les protéines codées par le gène correspondant selon différents cadres de lecture, qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par famille d'acides nucléiques codant pour une protéine on entend  
10 l'ensemble des séquences nucléiques ADNc et/ou ARN transcrits à partir d'un même gène ADN et, qui résultent d'un multi-épissage différentiel. Le gène ADN est transcrit avec des phénomènes d'épissage différentiels et conduit à la synthèse de différents acides nucléiques (ADNc, ARN) de séquences différentes. Toutes ces séquences ADNc et ARNm sont considérées comme appartenant à une même famille d'acides  
15 nucléiques.

Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de protéine précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragments de séquence SEQ ID N°30.

20 Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de protéine activatrice du GM2, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragments de séquences SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41 qui résultent d'un multi-épissage  
25 différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de protéine calgranuline B, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragments de séquences SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46, SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID  
30 N° 49, SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52 qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par exemple, par famille d'acides nucléiques codant pour la famille de protéine saposine B, on désigne la famille d'acides nucléiques comprenant *au moins* les acides nucléiques ou fragment de séquences SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55 qui résultent d'un multi-épissage différentiel du gène et/ou d'un cadre de lecture différent.

Par « épissage » on entend un mécanisme d'excision des introns et de raboutage des exons au cours de la maturation des transcrits et par "épissage différentiel" on entend l'existence de plusieurs schémas d'épissage d'un transcrit primaire aboutissant à la formation de différents ARN messagers et, pouvant donner lieu à la synthèse de plusieurs protéines différentes (Kaplan et Delpéch, Biologie Moléculaire et Médecine, 1993, 2<sup>ème</sup> édition, Médecine et Sciences, Flammarion, pages 73-77). CE phénomène est largement décrit dans la littérature scientifique. A titre d'exemple, on peut citer le modèle des gènes qui codent pour les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines, le modèle du gène de la dystrophine, le modèle du gène de l'alpha amylase, le gène de la myéline, etc...

II est connu que les gènes eucaryotes, notamment, comprennent des régions (exons) qui codent pour des fragments de la protéine codée par ledit gène et d'autres régions (introns) qui n'ont pas d'équivalent protéique. Ceci est dû au fait que les gènes sont d'abord transcrits en un ARN "primaire" qui est ensuite coupé par des enzymes d'épissage au niveau de sites nucléotidiques spécifiques (sites d'épissage). Ces enzymes raboutent ensuite les régions codant pour la protéine, reconstituant ainsi un ARN "secondaire" dont les régions introniques ont été éliminées. Par ailleurs, selon les phénotypes cellulaires (et donc les tissus ou la différenciation) ces enzymes ne sont pas toutes exprimées et, ainsi, un même ARN peut être épissé différemment dans les cellules d'un même individu, générant ainsi des protéines avec des différences de séquence. Cependant, ces phénomènes peuvent aussi s'appliquer à des régions nucléotidiques qui sont entièrement codantes (exons), mais qui, selon différents épissages possibles vont générer plusieurs protéines différentes à partir de la même région nucléotidique, par phénomène d'épissage différentiel entre les différents produits protéiques.

De plus, il est connu que des régions nucléotidiques peuvent avoir plusieurs cadres de lecture selon les trois trames potentielles du code génétique. Ainsi,

la présence de plusieurs codons initiateurs de traduction dans plusieurs phases de lecture et/ou un épissage d'ARN primaire raboutant des séquences nucléotiques présentes dans des phases de lectures différentes sur l'ADN, permet à une même région ADN de générer des produits protéiques sans rapports entre eux, du point de vue de la  
5 séquence peptidique.

Enfin, le polymorphisme génétique existant entre les individus d'une même espèce et/ou des mutations individuelles peuvent créer ou supprimer des sites d'épissage dans une région ADN donnée et, ainsi, modifier la séquence et la structure du ou des produits protéiques normalement produits par cette région.

10 Ainsi, la combinaison de ces différents phénomènes peut permettre qu'une même séquence nucléotidique correspondant à un segment d'ADN, identifiée comme déterminant une région génétique d'intérêt dans une étude donnée, comprenne l'information nécessaire et suffisante pour définir toute une famille d'ARN épissés selon des schémas différentiels et alternatifs, dans des cadres de lecture divers et, par là  
15 évidemment, de protéines et de polypeptides ayant des séquences " mosaïques " selon un cadre de lecture voire selon les trois cadres potentiels et des mutations éventuellement liées au polymorphisme génétique.

Un exemple de ce phénomène peut être représenté par la région nucléotidique du gène *env* du rétrovirus HIV-1. En effet, plusieurs protéines différentes  
20 sont codées par des segments de la même séquence : par exemple, la glycoprotéine d'enveloppe, et les protéines régulatrices TAT, REV, NEF, VIF.

Il est encore connu que des protéines peuvent résulter de l'assemblage de sous-unités identiques (homodimères, homomultimères) ou différentes (hétérodimères, hétéromultimères). Ainsi, les différents produits protéiques codés par une même région  
25 ADN peuvent aussi s'assembler entre eux pour constituer des entités protéiques complexes multimériques. Ce phénomène s'ajoute aux précédents et, lorsqu'une protéine est identifiée par un fragment peptidique, on peut logiquement identifier tous les autres éléments constitutifs de cette protéine complexe et les segments ADN et ARN épissé qui les codent, ainsi que tous les membres de la famille de produits protéiques et leurs assemblages.

30 Un autre exemple est fourni par la région d'ADN humain codant pour la famille de protéines MRP14 ou calgranuline B, MRP8, calprotectine, psoriasine etc...

Aussi, la présente invention a pour objet l'utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une

composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques précitées, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B. Dans des modes de réalisation particuliers au moins deux polypeptides précités sont utilisés en combinaison pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune.

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques précitées. Avantageusement les cinq polypeptides qui répondent à la définition précédente sont utilisés en combinaison.

De préférence, la séquence peptidique dudit polypeptide comprend, ou consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

L'invention concerne encore l'utilisation d'au moins un fragment d'un des  
5 polypeptiques précités pour la préparation d'un peptide immunogène, ledit peptide comprenant tout ou partie d'au moins une des séquences référencées SEQ ID N°s 58 à 65 et étant utilisé pour la production d'anticorps monoclonaux.

L'invention a également pour objet, l'utilisation d'au moins un fragment  
nucléotidique, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique  
10 ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N°  
15 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 ET SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent  
20 au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques ci dessus, et les fragments complémentaires desdits fragments, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine  
25 B. Il est à la portée de l'homme du métier de déterminer les séquences nucléiques des fragments nucléotidiques à partir des séquences peptidiques et du code génétique, ceci faisant partie de ses connaissances générales.

De préférence, ledit fragment nucléotidique code pour une protéine qui à  
30 l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N°s 1 à 8 et SEQ ID N°s 10 à 29 précitées, et parmi les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies



parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

Un autre objet de l'invention est l'utilisation d'au moins un fragment  
5 nucléotidique pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33,  
10 SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 69, SEQ  
15 ID N° 70 et SEQ ID N° 71 et leurs séquences complémentaires.

L'invention concerne également l'utilisation d'un ligand spécifique d'un polypeptide ou d'un fragment nucléotidique tel que défini ci dessus pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie  
20 dégénérative et/ou auto-immune.

Par ligand, on entend toute molécule susceptible de s'associer au polypeptide, tel que un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique, une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur. La production d'anticorps polyclonaux et monoclonaux fait partie des connaissances  
25 générales de l'homme du métier. On peut citer à titre de référence Köhler G. et Milstein C. (1975) : Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature 256 :495-497 et Galfre G. et al. (1977) Nature, 266 : 522-550 pour la production d'anticorps monoclonaux et Roda A., Bolelli G.F. : Production of high-titer antibody to bile acids, Journal of Steroid Biochemistry, Vol. 13, pp. 449-454  
30 (1980) pour la production d'anticorps polyclonaux.

Par ligand, on entend également toute molécule susceptible de s'associer à un fragment nucléotidique, tel qu'un fragment nucléotidique partiellement ou

5 totalement complémentaire, un polynucléotide complémentaire, un anticorps anti-acides nucléiques. La production de fragments nucléotidiques ou de polynucléotides fait partie des connaissances générales de l'homme du métier. On peut notamment citer l'utilisation d'enzymes de restriction, et la synthèse chimique sur synthétiseur  
10 automatique, par exemple sur des synthétiseurs commercialisés par la société Applied Biosystem. Par ailleurs, on connaît des techniques pour la production d'anticorps anti-acides nucléiques. On peut citer à titre d'exemples Philippe Cros et al., Nucleic Acids Researc, 1994, Vol. 22, N° 15, 2951-2957 ; Anderson, W.F. et al. (1988) Bioessays, 8 (2), 69-74 ; Lee, J.S. et al. (1984) FEBS Lett., 168, 303-306 ; Malfoy, B. et al. (1982) Biochemistry, 21(22), 5463-5467 ; Stollar, B.D. et al., J.J. (eds) Methods in Enzymology, Academic Press, pp. 70-85 ; Traincard, F. et al. (1989) J. Immunol. Meth., 123, 83-91 et Traincard, F. et al. (1989) Mol. Cell. Probes, 3, 27-38).

L'invention a encore pour objet un procédé pour détecter au moins une protéine associée à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon  
15 biologique dans lequel on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique d'au moins un polypeptide, ledit polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine et ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N°  
20 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement  
25 au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on  
30 détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand. Ledit ligand est avantageusement un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur,

un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

De même, l'invention concerne un procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N°s 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand. Le ligand est toute molécule qui répond aux conditions précédemment décrites.

De préférence, dans les procédés décrits ci dessus la séquence du polypeptide comprend ou consiste en une séquence peptidique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29 précédentes et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

L'invention concerne également un nouveau polypeptide qui comprend au moins un fragment d'une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9, ledit fragment présentant au moins une mutation, en particulier au moins deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8. Le polypeptide est

avantageusement choisi parmi les polypeptides qui comprennent la séquence en acides aminés FSWDNCFEGKDPVIR, référencée SEQ ID N° 68 et la séquence en acides aminés YSLPKSEFAVPDLELP, référencée SEQ ID N° 72.

En particulier, ledit polypeptide comprend ou consiste en SEQ ID N° 9.

- 5 Ce polypeptide est utilisé pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, seul ou en mélange avec au moins un polypeptide tel que défini précédemment.

- L'un des objet de l'invention est également un fragment nucléotidique qui  
10 code pour le fragment de la protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9, ledit fragment de ladite protéine présentant au moins une mutation, en particulier deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8. Ledit fragment nucléotidique, en particulier, comprend ou consiste en un fragment qui code pour SEQ ID N° 9. Ce fragment est utilisé pour obtenir une composition diagnostique,  
15 pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, seul ou en mélange avec au moins un fragment nucléotidique tel que défini précédemment.

- L'invention a aussi pour objet un procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon  
20 biologique, selon lequel on met en contact l'échantillon biologique avec au moins le polypeptide qui comprend ou consiste en SEQ ID N° 9 ou un mélange de polypeptides comprenant ce polypeptide et au moins un polypeptide tel que décrit ci dessus, puis on détecte la formation d'un complexe ou de complexes entre le ou les polypeptides et le ou les ligands correspondants ; étant entendu que par ligand on entend une molécule  
25 qui répond aux conditions précitées.

- L'invention concerne également un procédé pour détecter au moins le polypeptide référence SEQ ID N° 9 ou un fragment dudit polypeptide, ce fragment comprenant au moins une et de préférence deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N°8, dans un échantillon biologique selon lequel on met en contact  
30 l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique dudit polypeptide, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand. La définition de ligand correspond à celle définie précédemment. Il peut s'agir entre autres d'un

anticorps monoclonaux, d'un anticorps polyclonal, d'un substrat d'activité enzymatique, ou d'une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur, d'un récepteur.

On peut également mettre en contact l'échantillon biologique avec un ligand spécifique du polypeptide référence SEQ ID N°9 et au moins un ligand spécifique d'au moins un autre polypeptide tel que défini précédemment, puis on détecte la formation de complexes entre lesdits polypeptides et lesdits ligands spécifiques desdits polypeptides ; étant entendu que par ligand on entend une molécule qui répond aux conditions décrites précédemment.

Un autre objet de l'invention est un fragment nucléotidique codant pour tout ou partie du polypeptide SEQ ID N° 9, et son utilisation pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, éventuellement en association avec au moins un fragment nucléotidique tel que défini précédemment, et les fragments complémentaires desdits fragments.

Par fragment polypeptidique, on entend au moins tout ou partie de la séquence peptidique d'une protéine, en particulier un fragment polypeptique qui comprend environ entre 5 et 15 acides aminés et plus précisément environ entre 5 et 10 acides aminés et 6 et 15 acides aminés. Et par fragment nucléotidique, on entend au moins tout ou partie d'une séquence nucléotidique, étant entendu que par séquence nucléotidique, sont couvertes les séquences ADN et ARN.

En particulier, par fragment polypeptidique ou nucléotidique, on entend soit des fragments associés à une même unité moléculaire, soit des fragments dans un complexe moléculaire comprenant plusieurs sous-unités homologues ou hétérologues obtenues de manière naturelle ou artificielle, notamment par multi-épissage différentiel ou par synthèse sélective.

L'invention concerne aussi un procédé pour détecter au moins un polypeptide tel que défini précédemment, selon lequel on prélève un échantillon d'un fluide biologique d'un patient présentant un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune et éventuellement après purification dudit échantillon de fluide biologique, on analyse par spectrométrie de

masse le profil de masse obtenu à partir du fluide biologique et on compare à un profil de masse de référence.

La présente invention concerne également l'utilisation *d'au moins* un polypeptide de l'invention pour définir des agents efficaces thérapeutiquement, et  
5 l'utilisation de ces agents pour prévenir et/ou traiter une maladie auto-immune et/ou neurologique et/ou dégénérative, en particulier la sclérose en plaques.

Ainsi, d'autres objets de l'invention sont les suivants :

- Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique, ladite protéine étant  
10 choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23,  
15 SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de  
20 protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B ;

- Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour définir un matériel biologique pour la préparation d'une  
25 composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ  
30

ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlacan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison  
5 au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline et de la saposine ;

Selon une variante avantageuse de l'une des utilisations précédentes, le polypeptide est choisi parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 ;

10 - Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi les fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif  
15 correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ  
20 ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de  
25 protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

- Utilisation pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-  
30 immune, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments nucléotidiques définis au paragraphe précédent ;

- Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B ;

- Utilisation pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments nucléotidiques définis au paragraphe précédent.

Avantageusement, ledit fragment nucléotidique utilisé code pour ladite protéine.

De préférence, la séquence peptidique de ladite protéine à l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du



précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B. Les polypeptides sont préférentiellement choisis parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24.

- Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

- Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 68, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

La séquence nucléique est de préférence choisie parmi SEQ ID N° 30, 31, 42, 53.

- Utilisation de la lycorine pour la préparation d'une composition pour la prévention et/ou le traitement de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

Par efficacité thérapeutique, on entend le bénéfice clinique et biologique acquis après administration d'un agent thérapeutique en vue d'une amélioration, voire

d'une guérison de la maladie. Ce bénéfice se traduit entre autre par une diminution des signes cliniques, biologiques, et des effets pathologiques de la maladie après une analyse clinique par le médecin et/ou des analyses biologiques, telles que imagerie par résonance magnétique, analyse des bandes oligoclonales dans le liquide céphalo-  
5 rachidien, analyse de potentiels évoqués et le test de détection de gliotoxité appelé bio-essai, dont le principe est décrit dans la demande de brevet WO 98/11439 précédemment citée. Cette diminution des signes cliniques et effets pathologiques doit entraîner un bénéfice pour le patient (Schwartz et Lazar, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, eds Flammarion ; Lazar et Schwartz, 1995, Eléments de  
10 statistique médicale et biologique, eds Flammarion ). La maladie étudiée de préférence est la sclérose en plaques.

On entend par composition à usage prophylactique et/ou thérapeutique, toute composition qui comprend un agent thérapeutiquement efficace. Ces agents thérapeutiques sont capables (i) d'influencer de manière qualitative et/ou quantitative  
15 l'activité biologique et/ou la fonction des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention, de préférence l'activité gliotoxique et/ou (ii) de moduler et/ou d'inhiber l'expression de ces protéines et/ou (iii) de diminuer la concentration de ces protéines dans un compartiment extracellulaire et/ou intracellulaire, et/ou de substituer une forme non pathogène à une forme pathogène, par exemple mutée, d'une de ces protéines et/ou  
20 de moduler leur fixation à au moins un de leur ligand ; ledit ligand étant une molécule qui répond aux critères précédemment décrits. Différents agents thérapeutiques sont produits en suivant les approches classiques largement décrites dans la littérature. Les différents groupes d'agents thérapeutiques définis à partir des protéines d'intérêt identifiées dans cette présente invention sont décrits ci-dessous. Leur activité ou  
25 efficacité prophylactique et/ou thérapeutique est évaluée *in vitro* et/ou *in vivo*.

Evaluation de l'efficacité d'un agent thérapeutique *in vitro* : des échantillons d'urine d'individus sains et de patients atteints de la sclérose en plaque, de préférence en phase active, sont testés pour leur activité gliotoxique *in vitro* en suivant le protocole du bio-essai décrit dans la demande de brevet WO 98/11439,  
30 précédemment citée. L'expérience est réalisée en parallèle en ajoutant ou non dans les échantillons d'urine testés l'agent thérapeutique dont l'efficacité est à tester. Des essais sont réalisés à différentes concentrations de cet agent, et après différents temps

d'incubation avec l'échantillon, à une température d'environ 37°C ou à température ambiante, pour chaque concentration d'agent testé, avant la réalisation du test bio-essai. L'activité gliotoxique est déterminée pour chaque échantillon brut ou purifié d'urine témoin et de patient en présence ou en absence de l'agent thérapeutique testé. Un agent  
5 prophylactique et/ou thérapeutique pour la sclérose en plaques est un agent qui permet une diminution ou une inhibition de l'activité gliotoxique dans un fluide biologique des patients, en particulier dans l'urine. Cette diminution ou inhibition est évaluée par rapport à l'activité gliotoxique détectée dans le fluide biologique des patients SEP en absence de l'agent testé qui fixe la borne supérieure et par rapport à l'activité  
10 gliotoxique détectée dans l'urine d'individu sain qui détermine la borne inférieure (Schwartz et Lazar, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, eds Flammarion ; Lazar et Schwartz, 1995, Elements de statistique médicale et biologique, eds Flammarion). L'efficacité thérapeutique de plusieurs agents peuvent être évaluée en combinaison dans un même essai.

15 Evaluation de l'efficacité d'un agent thérapeutique utilisant un modèle animal : à un animal sont injectées des fractions d'urine purifiée et/ou au moins un polypeptide de l'invention et/ou au moins une protéine obtenue par recombinaison génétique qui correspond à au moins un polypeptide de l'invention et/ou au moins un polypeptide de synthèse dont la séquence en acides aminés correspond à la séquence  
20 d'au moins un polypeptide de l'invention. Les injections sont effectuées, à différentes concentrations établies, à des animaux mammifères, tels que souris ou rat, de préférence un rat Lewis selon le protocole décrit dans la demande de brevet WO97/33466 citée précédemment. A des séries d'animaux sont injectées, par voie intradermique, intraveineuse, intrathécale, intracérébrale, intramusculaire, ou autres,  
25 différentes concentrations d'une fraction d'urine brute ou purifiée ou d'au moins un polypeptide et/ou une protéine, tels que définis ci-dessus. Un contrôle négatif est effectué en parallèle. L'agent prophylactique et/ou thérapeutique à évaluer et ensuite injecté à différentes concentrations et par différentes voies d'administration à un animal mammifère, de préférence à une souris ou à un rat. Les injections sont réalisées  
30 en une seule dose ou en doses répétées, avec différents temps d'intervalle entre chaque administration. Quelques heures à quelques semaines après l'administration, des

échantillons biologiques, de préférence du sang, du sérum, du liquide céphalo-rachidien, de l'urine sont prélevés. Sur ces échantillons sont réalisés :

- (i) une mesure de l'activité gliotoxique par le bio-essai, et/ou
- (ii) une mesure d'activité des polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention, seuls ou en combinaison comme décrit au moins dans : Li et al., 1983, Am J Hum Genet 35 :629-634 ; Li et al., 1988 J Biol Chem 263 : 6588-6591 ; Li et al., 1981 J Biol Chem 256 : 6234-6240 ; Li et al., 1976 J Biol Chem 251 :1159 ; Kase et al., 1996, FebsLetters 393 : 74-76 ; Kishimoto et al., 1992, J Lipid Res 33 : 1255-1267 ; O'Brien et al., 1991 Faseb J 5 : 301-308 ; Murthy et al., 1993 J Immunol 151 : 6291-6301 ;  
10 Murao et al., 1990 Cell growth Differ 1 : 447-454, et/ou
- (iii) un dosage des polypeptides et/ou protéines d'intérêt, seuls ou en combinaison, par ELISA (Enzyme Linked-Immunosorbant Assay) et/ou Western Blot, en utilisant des anticorps ou des fragments d'anticorps capables de se fixer à au moins un des polypeptides et/ou protéines de l'invention, ou leur fragment, et/ou
- 15 iv) un dosage d'anticorps spécifiques des polypeptides et/ou protéines d'intérêt ou leurs fragments, seuls ou en combinaison ou le dosage d'au moins un ligand capable de se fixer aux polypeptides et/ou protéines d'intérêt ou leurs fragments, et/ou
- (v) un dosage de la réponse immune cellulaire « helper » et/ou cytotoxique induite contre les polypeptides et protéines d'intérêt ou leurs fragments et tout peptide  
20 immunogène dérivant de ces polypeptides, protéines et fragments, en réalisant, par exemple, un test d'activation *in vitro* de cellules lymphocytes T " helper " spécifiques de l'antigène administré ; en quantifiant les lymphocytes T cytotoxiques selon la technique dite ELISPOT décrite par Scheibenbogen et al., 1997 Clinical Cancer Research 3 : 221-226. Une telle détermination est particulièrement avantageuse lorsque  
25 l'on veut évaluer l'efficacité d'une approche vaccinale pour la mise en œuvre chez un patient donné ou pour diagnostiquer et/ou pronostiquer un état pathologique potentiel en cherchant à mettre en évidence une réponse immune naturellement développée par le patient contre l'antigène, les polypeptides, les protéines d'intérêt ou les fragments immunogènes dérivés de ces protéines.

30 Par « ligand capable de se fixer à une protéine », on entend toute molécule capable de reconnaître la protéine ou une partie de la protéine. Cela peut être vérifié par exemple *in vitro* par tests Elisa et/ou Western blot .

On désigne par « polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention » le fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N°2), le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (SEQ ID N°4), la protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la saposine B (SEQ ID N° 24), les protéines ou fragments appartenant à la famille du précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (par exemple SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à 23), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

L'animal est ensuite sacrifié et des coupes histologiques de différents tissus sont réalisées, de préférence des coupes de cerveaux. Différentes études et observations sont réalisées pour détecter et/ou quantifier les effets caractéristiques des polypeptides et/ou protéines actives associées à la fraction gliotoxique, c'est à dire une apoptose des cellules gliales, et/ou l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique, et/ou une démyélinisation. La présence ou l'expression des polypeptides et/ou protéines d'intérêt identifiées est également observée et/ou quantifiée dans ces tissus :

- (i) par des analyses d'immunohistologie classiques en utilisant des ligands des polypeptides et/ou protéines d'intérêt et/ou leurs fragments et/ou des anticorps monoclonaux ou polyclonaux ou des fragments desdits qui se lient aux polypeptides et/ou protéines d'intérêt, ou à leurs fragments, et/ou
- (ii) par des techniques d'hybridation *in situ* classiques en utilisant des fragments d'acides nucléiques ou des oligonucléotides définis à partir des séquences polypeptidiques et/ou protéiques d'intérêt ; et/ou
- (iii) par des techniques d'amplification par PCR et/ou RT-PCR *in situ* en utilisant des fragments d'acides nucléiques ou des amorces définis à partir des séquences polypeptidiques et/ou protéiques d'intérêt.

Par anticorps capable de se fixer à un polypeptide, à une protéine ou à leurs fragments, on entend tout anticorps monoclonal ou polyclonal et tout fragment

desdits anticorps capable de reconnaître le polypeptide, la protéine ou leurs fragments. La capacité des anticorps à reconnaître lesdits polypeptides, protéines ou leurs fragments est vérifiée *in vitro*, par exemple en ELISA et/ou Western Blot. Un anticorps capable de se fixer à la protéine saposine B (SEQ ID N° 24) ou à tout  
5 fragment de cette protéine est décrit par Misasi et al. 1998, J. NeuroChem. 71 : 2313 et Klein et al. 1994, BBRC 200 : 1440-1448 ou peut être produit en utilisant les méthodes conventionnelles, par exemple celles référencées précédemment pour la production d'anticorps monoclonaux et polyclonaux, par immunisation à partir de la protéine naturelle, d'une protéine recombinante, d'un polypeptide de synthèse ou de leurs  
10 fragments. Les peptides immunogènes pour la production d'anticorps monoclonaux anti-saposine B sont les peptides correspondant aux séquences SEQ ID N° 61 et SEQ ID N° 62.

Par exemple, un anticorps capable de se fixer à la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) ou à tout fragment de cette protéine est illustré par Yuziuk *et al.*,  
15 1998 J Biol Chem 273 : 66-72 ou peut être produit en utilisant les méthodes conventionnelles connues de l'homme de l'art. Cet anticorps peut être par exemple produit après injection à des souris ou lapin de la protéine naturelle ou tout fragment, et/ou de la protéine recombinante ou tout fragment, et/ou de peptides définis et synthétisés à partir de la séquence protéique de la protéine. Les peptides immunogènes  
20 utilisés pour la production d'anticorps monoclonaux anti-GM2 sont les peptides références SEQ ID N° 58, SEQ ID N° 59 et SEQ ID N° 60. Un anticorps capable de se fixer à la protéine Galgranuline B (SEQ ID N° 17) ou à tout fragment de cette protéine est décrit par Saintigny *et al.*, 1992 J Invest Dermatol 99 : 639-644 et Goebeler et al 1994 J Leukoc Biol 55 : 259-261, ou peut être produit en utilisant les méthodes  
25 conventionnelles. Les peptides immunogènes pour la production d'anticorps monoclonaux anti-calgranuline B sont les peptides correspondant aux séquences SEQ ID N° 63, SEQ ID N° 64 et SEQ ID N° 65. Un anticorps capable de se fixer à la protéine mutée activatrice du GM2 (SEQ ID N°9) ou à tout fragment de cette protéine peut être produit en utilisant les méthodes conventionnelles définies ci dessus.

30 Par protéine naturelle et fragment, on entend toute protéine isolée, purifiée totalement ou partiellement obtenue à partir d'échantillon humain ou animal et tout fragment obtenu à partir de cette protéine. Par exemple, on obtient la protéine naturelle

correspondant à la saposine B (SEQ ID N° 24) en suivant la technique décrite par Waring et al. 1998 Mol Genet Metab 63 : 14-25 ; la protéine naturelle correspondant à la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) en suivant la technique décrite par DeGasperi et al., 1989 Biochem J 260 : 777-783, Vogel et al., 1987 Arch Biochem Biophys 259 : 627-638, Mitsuyama, 1983 Hokkaido Igaku Zasshi 58 : 502-512 ;  
5 Hirabayashi et al 1983 J Neurochem 40 : 168-175, Conzelmann et al, 1979 Hoppe Seylers Z Physiol Chem 360 : 1837-1849, Li et al., 1976 J Biol Chem 251 : 1159-1163. La protéine naturelle correspondant à la calgranuline B (SEQ ID N° 17) est obtenue en suivant la technique décrite par Hitomi et al. 1996 J Cell Sci 109 : 805-815, Van den  
10 Bos et al. 1998 Protein Expr Purif 13 : 313-318 et Raftery et al. 1996 Biochem J 316 : 285-293.

Par protéine recombinante ou fragment d'une protéine recombinante, on fait référence à toute protéine ou fragment de protéine produit dans une cellule procaryote ou eucaryote à partir d'une séquence nucléotidique codant pour la protéine  
15 ou son fragment et transfectée dans la cellule, cette protéine ou son fragment étant ensuite purifiée. D'une manière générale, toute cellule issue d'un organisme procaryote ou eucaryote peut être utilisée dans le cadre de la présente invention, mais les cellules issues d'organismes eucaryotes sont préférées. On peut citer à titre d'exemple les cellules CHO, les cellules COS, les cellules Semliki. Aux fins de la présente invention,  
20 ladite cellule peut être sauvage ou mutante. Par exemple, la protéine recombinante correspondant à la saposine B (SEQ ID N° 24) peut être obtenue en suivant les techniques décrites par Zaltash et al. 1998 Bebb's letter 423 : 1-4 et Qi et al. 1994 J Biol Chem 269 : 16746-16753. Une telle protéine recombinante est au moins disponible auprès de Kase et al. 1996 Febs Lett 393 : 74-76. La protéine recombinante  
25 correspondant à la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) peut être produite par les techniques décrites par Yuziuk et al. 1998 J Biol Chem 273 : 66-72 et Bierfreund et al., 1999 Neurochem Res 24 : 295-300. La protéine recombinante correspondant à la calgranuline B (SEQ ID N° 17) peut être obtenue selon le protocole de Longbottom et al. 1992 Biochim Biophys Acta 1120 : 215-222, Raftery et al. 1999 Protein Expr Purif  
30 15 : 228-235. Une telle protéine recombinante est disponible au moins auprès de Klempt et al. 1997 Febs Letter 408 : 81-84.

Par séquence nucléotidique d'ADN ou fragment nucléotidique d'ADN codant pour tout ou partie de la protéine saposine B (SEQ ID N°24), on entend la séquence d'acides nucléiques SEQ ID N° 53 ou un fragment de cette séquence. Par séquence ou fragment nucléotidique ARN codant pour tout ou partie de la protéine saposine B (SEQ ID N° 24), on entend toute séquence déduite de la séquence d'ADN SEQ ID N° 53, en tenant compte du code génétique et des phénomènes d'épissage.

Par séquence nucléotidique d'ADN ou fragment nucléotidique d'ADN codant pour tout ou partie de la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8), on entend la séquence d'acides nucléiques SEQ ID N° 31 ou un fragment de cette séquence. Par séquence ou fragment nucléotidique d'ARN codant pour tout ou partie de la protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8), on entend toute séquence déduite de la séquence ADN SEQ ID N° 31, en tenant compte du code génétique et des phénomènes d'épissage.

Par séquence nucléotidique d'ADN ou fragment nucléotidique d'ADN codant pour tout ou partie de la protéine calgranuline B (SEQ ID N° 17), on entend la séquence d'acides nucléiques SEQ ID N° 42 ou un fragment de cette séquence. Par séquence ou fragment nucléotidique d'ARN codant pour tout ou partie de la protéine calgranuline B (SEQ ID N° 17), on entend toute séquence déduite de la séquence ADN SEQ ID N° 42, en tenant compte du code génétique et des phénomènes d'épissage.

Par séquence ou fragment nucléotidique codant pour tout ou partie de la protéine mutée (SEQ ID N° 9), on entend la séquence d'acides nucléiques déduite de la séquence SEQ ID N° 9, en tenant compte du code génétique. Par séquence ou fragment nucléotidique ARN codant pour tout ou partie de cette protéine mutée B (SEQ ID N° 9), on entend toute séquence déduite de la séquence ADN, en tenant compte du code génétique et des phénomènes d'épissage.

Par activité protéique, on entend une fonction caractéristique biologique de la protéine. Cette activité protéique peut être mise en évidence par des techniques connues de l'homme de l'art. Par exemple, l'activité de la saposine B (SEQ ID N° 24) et des protéines de la famille de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29), peut être détectée par la mise en œuvre des protocoles décrits par Li et al., 1983, Am J Hum Genet 35 :629-634.; Li et al., 1988 J Biol Chem 263 : 6588-6591, Li et al., 1981 J Biol Chem 256 : 6234-6240 et Li et al., 1976 J Biol Chem 251 :1159. Par activité de la



protéine activatrice du GM2 (SEQ ID N° 8) et des protéines de la même famille (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), on entend au moins l'activité détectée par la mise en œuvre des protocoles décrits par exemple par Kase et al., 1996, Febs Letters 393 : 74-76, Kishimoto et al., 1992, J Lipid Res 33 : 1255-1267 et O'Brien et al., 1991 Faseb J 5 : 301-308. Par activité de la calgranuline B (SEQ ID N° 17) et les protéines de la même famille de la calgranuline b (par exemple SEQ ID N° 18 à 23) et toute, on entend au moins l'activité détectée par la mise en œuvre des protocoles décrits par exemple par Murthy et al., 1993 J Immunol 151 : 6291-6301 et Murao et al., 1990 Cell growth Differ 1 : 447-454.

10 L'obtention d'un modèle animal transgénique, de préférence murin, pour une pathologie humaine est techniquement réalisable. Brièvement, l'animal transgénique est produit en utilisant les techniques conventionnelles décrites et possède intégré dans son génome les acides nucléiques codant pour les protéines ou leurs fragments.

15 Evaluation de l'efficacité d'un agent thérapeutique et suivi thérapeutique *ex vivo*, chez l'homme :

les agents thérapeutiques à tester pour une activité thérapeutique et/ou pour un suivi thérapeutique sont administrés par différentes voies à l'homme, telles que les voies intradermique, intraveineuse, intramusculaire, intracérébrale, orale, ou autres.

20 Différentes doses sont administrées à l'être humain. Le dossier clinique du patient au moment de la première administration est parfaitement connu. Une ou plusieurs administrations peuvent être réalisées avec des temps d'intervalle différents entre chaque administration pouvant aller de quelques jours à quelques années. Des échantillons biologiques sont prélevés à des intervalles de temps déterminés après

25 administration de l'agent thérapeutique, de préférence du sang, du sérum, du liquide céphalo-rachidien et de l'urine. Différentes analyses sont réalisées à partir de ces échantillons. Juste avant la première administration de l'agent thérapeutique, ces prélèvements et ces mêmes analyses sont également réalisés. Un examen clinique et biologique classique (IRM, bandes oligoclonales dans le liquide céphalo-rachidien,

30 potentiels évoqués) est réalisé également en parallèle des analyses supplémentaires qui sont être décrites ci dessous, à différentes temps de l'analyse. Les analyses réalisées sont :

- (i) une mesure de l'activité gliotoxique par le bio-essai à partir d'échantillons de sérum, de LCR et d'urine, et/ou
- (ii) une mesure d'activité des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention seules ou en combinaison comme décrit par exemple par : Li et al., 1983, Am J Hum Genet 35 :629-634 ; Li et al., 1988 J Biol Chem 263 : 6588-6591 ; Li et al., 1981 J Biol Chem 256 : 6234-6240 ; Li et al., 1976 J Biol Chem 251 :1159 ; Kase et al., 1996, FebsLetters 393 : 74-76 ; Kishimoto et al., 1992, J Lipid Res 33 : 1255-1267 ; O'Brien et al., 1991 Faseb J 5 : 301-308 ; Murthy et al., 1993 J Immunol 151 : 6291-6301 ; Murao et al., 1990 Cell growth Differ 1 : 447-454, et/ou
- (iii) un dosage des protéines d'intérêt ou de leurs fragments, seuls ou en combinaison, dans les échantillons de sang/sérum, LCR, urine par ELISA et/ou Western Blot, en utilisant des anticorps ou des fragments d'anticorps capables de se fixer à au moins une des protéines ou à un de leur fragment, et/ou
- (iv) un dosage d'anticorps spécifiques des protéines d'intérêt ou de leurs fragments dans des échantillons de sang/sérum, LCR, urine, par ELISA et/ou Western blot en utilisant une protéine naturelle ou un fragment de la protéine naturelle et/ou une protéine recombinante ou un fragment de cette protéine recombinante, seuls ou en combinaison. De même un dosage de ligands capables de se fixer aux protéines d'intérêt identifiées, seules ou en combinaison, peut être réalisé, et/ou
- (v) un dosage de la réponse immune cellulaire « helper » et/ou cytotoxique induite contre les protéines d'intérêt et tout peptide immunogène dérivant de ces protéines, par exemple en réalisant un test d'activation *in vitro* de cellules lymphocytes T spécifiques de l'antigène administré (exemple). Par exemple en réalisant un test d'activation *in vitro* de cellules lymphocytes T helper spécifiques de l'antigène administré (exemple) ; Par exemple en quantifiant les lymphocytes T cytotoxiques selon la technique dite ELISPOT décrite par Scheibenbogen et al., 1997 Clinical Cancer Research 3 : 221-226. Une telle détermination est particulièrement avantageuse lorsque l'on souhaite évaluer l'efficacité d'une approche vaccinale mise en œuvre chez un patient donné ou pour diagnostiquer un état pathologique potentiel chez un patient en cherchant à mettre en évidence une réponse immune naturellement développée par ledit patient contre l'antigène les protéines d'intérêt ou tout fragment immunogène dérivés de ces protéines, seuls ou en combinaison, et/ou
- (vi) une détection de fragments d'ADN et/ou d'ARN codant pour les protéines ou un fragment des protéines d'intérêt par hybridation nucléotidique selon les techniques bien

connues de l'homme de l'art (Southern blot, Northern blot, ELOSA " Enzyme-Linked Oligosorbent Assay " (Katz JB et al., Am. J. Vet. Res., 1993 Dec ; 54 (12) :2021-6 et François Mallet et al., Journal of Clinical Microbiology, June 1993, p1444-1449)) et/ou par méthode d'amplification de l'ADN et/ou l'ARN , par exemple par PCR, RT-PCR, en utilisant des fragments d'acides nucléiques codant pour la séquence des protéines d'intérêt, et/ou

(vii) par biopsie de tissus, de préférence du cerveau, et l'observation des effets caractéristiques des protéines actives associées à la fraction gliotoxique, c'est à dire une apoptose des cellules gliales et/ou l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique et/ou l'observation de phénomènes de démyélinisation, et/ou

(viii) par biopsie de tissus ou sur cellules circulantes (sang, LCR), l'observation de la présence des protéines d'intérêt et l'estimation de leur expression par observation immunohistologique sur des coupes histologiques réalisées à partir des tissus, en utilisant des ligands et/ou des anticorps ou leurs fragments capables de se fixer aux protéines d'intérêt, et/ou

(ix) par biopsie de tissus ou sur cellules circulantes (sang, LCR), l'observation de l'expression des protéines d'intérêt par hybridation in situ des molécules d'ARN codant pour les protéines d'intérêt en utilisant des acides nucléiques définis à partir des séquences des protéines d'intérêt, et/ou

(x) par biopsie de tissus ou sur cellules circulantes (sang, LCR), la détermination de l'expression des protéines d'intérêt par amplification de ces ARN par des techniques classiques, comme par exemple, la RT-PCR, en utilisant des acides nucléiques définis à partir des séquences des protéines d'intérêt.

On désigne par « polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention » le fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N°2), le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (SEQ ID N°4), la protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la saposine B (SEQ ID N° 24), les protéines ou fragments appartenant à la famille du précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (par exemple SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à

23), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

5 On désigne par séquence d'acides nucléiques ADN ou fragments codant pour les 'polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention' la séquence d'acides nucléiques codant pour le fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N°2), la séquence d'acides nucléiques codant pour le précurseur de la protéine plasmique de liaison au rétinol (SEQ ID N°4), la séquence d'acides nucléiques (SEQ ID N° 31) codant pour la  
10 protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la séquence d'acides nucléiques codant pour la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la séquence d'acides nucléique (SEQ ID N° 42) codant pour la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la séquence d'acides nucléiques (SEQ ID N°53) codant pour la saposine B (SEQ ID N° 24), les  
15 séquences d'acides nucléiques ADN et/ou ARN (SEQ ID N° 30 à 57) codant pour les protéines ou fragments appartenant à la famille du précurseur de la protéine plasmique de liaison au rétinol (par exemple SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à 23), les protéines ou fragments  
20 appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29).

Une protéine ou un variant d'une protéine choisie plus particulièrement parmi les séquences définies dans les identificateurs SEQ ID N°s 2, 4, 8, 9, 17 et 24 ou leurs fragments, ou parmi les séquences correspondant aux protéines des familles de ces dites séquences (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ  
25 ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 24, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, indépendamment ou en combinaison, présente un effet toxique directement ou indirectement, vis à vis de cellules, en particulier vis à vis des  
30 cellules gliales, qui est mis en évidence par le bio-essai précité. Les auto-anticorps produits en réponse à la présence de cette protéine ou de ces protéines sont associés au processus auto-immun. Ainsi, la cible du ou des agent(s) thérapeutique(s) est par

exemple (i) la protéine naturelle ou les protéines naturelles ou leurs variants dans le but de réguler leur expression et/ou leur concentration intracellulaire et/ou leur concentration dans la circulation, (ii) un anticorps spécifique d'au moins une telle protéine. L'agent thérapeutique ou les agents thérapeutiques définis éliminent la cible  
5 directement, par induction d'une réponse immune spécifique et/ou la neutralisent.

La présente invention concerne donc un matériel biologique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de mammifères atteints de pathologies dégénérative et/ou auto-immune et/ou neurologique, de préférence la sclérose en plaques, ladite composition comprenant :

10 (i) soit au moins une protéine naturelle et/ou une protéine recombinante ou leurs fragments dont la séquence correspond à tout ou partie des séquences référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de  
15 l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29,  
20 indépendamment ou en combinaison,

(ii) soit au moins un ligand spécifique d'au moins une desdites protéines ou leurs fragments dont la séquence correspond à tout ou partie des séquences référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie  
25 parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au  
30 moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, indépendamment ou en combinaison,

(iii) soit au moins un anticorps polyclonal ou monoclonal spécifique d'au moins une desdites protéines ou leurs fragments dont la séquence correspond à tout ou partie des séquences référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et  
5  
10  
avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, indépendamment ou en combinaison,

(iv) soit au moins une séquence d'acide nucléique comprenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique dont la séquence nucléique est déduite des séquences d'ADN et d'ARN codant pour tout ou partie des protéines dont les séquences sont  
15  
référéncées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences d'ADN et/ou ARN (par exemple SEQ ID N° 30 à 57) codant pour tout ou partie des protéines appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, en association avec des éléments assurant  
20  
l'expression dudit gène d'intérêt thérapeutique *in vivo* dans des cellules cibles destinées à être génétiquement modifiées par la séquence nucléique du gène d'intérêt thérapeutique,

(v) soit au moins une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement la protéine d'intérêt ou les protéines d'intérêt ou tout fragment de cette  
25  
ou de ces protéine(s) ou des anticorps spécifiques d'au moins une desdites protéines ou de ses fragments ladite cellule mammifère étant génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique ou un fragment d'une séquence d'acide nucléique ou une association de séquences d'acides nucléiques correspondant à des fragments d'acides nucléiques issus d'un même gène ou de gènes différents, la ou  
30  
lesdites séquences nucléiques étant déduite(s) des séquences d'ADN et ARN codant pour les protéines référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences d'ADN et/ou ARN (par exemple SEQ ID N° 30 à 57) codant pour tout ou partie des protéines

appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, ledit gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie de la protéine d'intérêt, d'un fragment de la protéine d'intérêt ou d'un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt qui sera exprimé à la surface de ladite cellule de mammifère (Toes et al., 1997, PNAS 94 : 14660-14665). La composition pharmaceutique peut contenir un agent thérapeutique seul dirigé contre une cible seule ou des agents pris en combinaison dirigés contre plusieurs cibles.

On désigne par « polypeptides et/ou protéines d'intérêt de l'invention » le fragment C-terminal du perlecan (SEQ ID N° 2), le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (SEQ ID N° 4), la protéine activateur du GM2 (SEQ ID N° 8), la protéine mutée de l'activateur du GM2 (SEQ ID N° 9), la calgranuline B (SEQ ID N° 17), la saposine B (SEQ ID N° 24), les protéines ou fragments appartenant à la famille du précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol (par exemple SEQ ID N° 5 à 7), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine activateur du GM2 (par exemple SEQ ID N° 10 à 16), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine calgranuline B (par exemple SEQ ID N° 18 à 23), les protéines ou fragments appartenant à la famille de la protéine saposine B (par exemple SEQ ID N° 25 à 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

A partir des connaissances des séquences en acides aminés des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention, il est à la portée de l'homme de l'art de définir et utiliser les molécules décrites ci dessus et/ou toute molécule capable de se fixer au dites molécules, et/ou toute molécule capable d'inhiber lesdites molécules. Ainsi la présente invention concerne l'utilisation de protéines naturelles et/ou recombinantes et/ou de polypeptides de synthèse et leurs fragments, de ligand capables de se fixer au dites protéines ou à leur(s) fragment(s), par exemple des anticorps ; de protéines inhibitrices de la fonction et/ou de l'expression et/ou de la fixation desdites protéines.

Utilisation de protéine(s) et/ou peptide(s) naturel(s) et/ou de protéine(s) recombinante(s) et/ou de polypeptide(s) de synthèse correspondant aux protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, comprenant :

(i) soit au moins une protéine naturelle et/ou une protéine recombinante et/ou un polypeptide de synthèse choisi parmi les protéines dont les séquences en acides aminés sont référencées SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, seules ou en combinaison,

(ii) soit au moins un fragment naturel et/ou synthétique de ces protéines d'intérêt, par exemple un fragment immunogène capable d'induire une réponse immune contre un polypeptide cible,

(iii) soit au moins un peptide mimotope défini à partir des séquences de référence SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou une combinaison de mimotopes, capable d'induire une réponse immune contre le polypeptide cible,



(iv) soit au moins toute protéine ou peptide pouvant réguler *in vivo* la transcription et/ou la traduction des protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. L'administration de ces protéines et/ou peptides seuls ou en combinaison peut rétablir la concentration d'une protéine d'intérêt dans l'organisme.

La réponse immune dirigée contre un antigène spécifique peut être divisée en deux catégories distinctes, l'une mettant en jeu les anticorps (réponse immune de type humorale), l'autre les cellules effectrices cytotoxiques telles que par exemple les macrophages, les lymphocytes cytotoxiques (CTL) ou les cellules tueuses (NK) ainsi que les lymphocytes T « helper », notamment les lymphocytes T CD4+ (réponse immune de type cellulaire). Plus particulièrement, les deux types de réponse se distinguent en ce que les anticorps reconnaissent les antigènes sous leur forme tridimensionnelle alors que les lymphocytes T, par exemple, reconnaissent des portions peptidiques desdits antigènes, associés à des glycoprotéines codées par les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), notamment les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type I qui sont exprimés de façon ubiquitaire à la surface des cellules ou les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité de type II qui sont exprimés de façon spécifique à la surface des cellules impliquées dans la présentation des antigènes (APC). 1) Selon un premier aspect, la réponse immune de type cellulaire est caractérisée en ce que les cellules T de type CD4+ (cellules T helper), suite à un phénomène d'activation bien connu (pour une revue voir Alberola-lia 1997, Annu Rev Immunol 15, 125-154) produisent des cytokines qui à leur tour induisent la prolifération de cellules APC capables de produire lesdites cytokines, la différenciation cellulaire des lymphocytes B capables de produire des anticorps spécifiques de l'antigène, et la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). 2)

Selon un second aspect de la réponse immune cellulaire, les cellules effectrices cytotoxiques telles que par exemple les lymphocytes de type CD8+ (CTL) sont activés a) après interaction avec des peptides antigéniques fixés sur et présentés par les glycoprotéines portées par les cellules ubiquitaires et codées par les gènes appartenant au système CMHI, et b) éventuellement par les cytokines produites par les CD4+.

La présente invention concerne l'administration d'une protéine ou d'un peptide dérivés des protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) ou de leur(s) fragment(s), et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, seuls ou en combinaison, pour la prophylaxie et/ou la thérapie d'une maladie auto-immune, telle que la sclérose en plaques. Ces protéines et peptides administrés sont caractérisés en ce que ils doivent avoir perdu leur activité toxique, par exemple leur activité gliotoxique, ou avoir perdu leur capacité à se fixer à un ligand, et peuvent induire significativement une réponse immune médiée par les lymphocytes T ou/et les anticorps dirigée contre cette protéine sont utilisés. De telles protéines sont dites 'modifiées', cependant leur immunogénicité est conservée. De telles molécules immunogéniques modifiées sont obtenues par un nombre de traitements conventionnels, par exemple la dénaturation chimique ou à la chaleur, la troncation ou la mutation avec délétion, insertion ou emplacement d'acides aminés. Un exemple de troncation consiste en la troncation d'acides aminés à l'extrémité carboxy-terminale pouvant aller jusqu'à 5-30 acides aminés. Les molécules modifiées peuvent être obtenues par des techniques synthétiques ou/et recombinantes ou par des traitements chimiques ou physiques des molécules naturelles.

Les protéines d'intérêt naturelles et/ou recombinantes identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 25), et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies

parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s), sont utilisées en vaccination prophylactique et thérapeutique contre les maladies auto-immunes, de préférence la SEP. Un vaccin comprend une quantité immunogénique effective de la protéine immunogène en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement un adjuvant et/ou un diluant. Les véhicules, adjuvants et diluants pharmaceutiquement acceptables sont bien connus de l'homme du métier. On peut citer à titre de référence le Remington's Pharmaceutical Sciences. L'utilisation de compositions vaccinales est particulièrement avantageuse en association avec un diagnostic précoce de la maladie. La protéine immunogène est utilisée dans la préparation de médicament pour la vaccination prophylactique ou thérapeutique. Les protéines d'intérêt peuvent être éliminées de l'organisme sans induire d'effets secondaires indésirables. L'identification de telles protéines ou peptides vaccins est réalisée comme suit : les molécules candidates modifiées comme décrit précédemment (protéines naturelles, recombinantes, peptides) sont analysées dans un test fonctionnel pour vérifier qu'elles ont perdues leur toxicité, par exemple leur activité gliotoxique en utilisant le test appelé bio-essai, et pour vérifier leur immunogénicité (i) en réalisant un test *in vitro* de prolifération de lymphocytes T CD4+ spécifiques de l'antigène administré (T cell assay) ou un test *in vitro* de cytotoxicité des lymphocytes CD8+ spécifiques de l'antigène administré et (ii) en mesurant entre autre le taux d'anticorps circulants dirigés contre la protéine naturelle. Ces formes modifiées sont utilisées pour immuniser des hommes par des procédures standard avec des adjuvants appropriés.

Les vaccins préparés sont injectables, c'est-à-dire en solution liquide ou en suspension. En option, la préparation peut aussi être émulsifiée. La molécule antigénique peut être mélangée avec des excipients qui sont pharmaceutiquement acceptables et compatibles avec l'ingrédient actif. Des exemples d'excipients favorables sont l'eau, une solution saline, le dextrose, le glycérol, l'éthanol ou des

équivalents et leurs combinaisons. Si désiré, le vaccin peut contenir des quantités mineures de substances auxiliaires comme des agents "wetting" ou émulsifiants, des agents qui tamponnent le pH ou des adjuvants comme l'hydroxide d'aluminium, le dipeptide muramyl ou leurs variations. Dans le cas des peptides, leur couplage à une plus grosse molécule (KLH, toxine tétanique) augmente quelquefois l'immunogénicité. Les vaccins sont administrés conventionnellement par injection par exemple sous cutanée ou intramusculaire. Des formulations additionnelles favorables avec d'autres modes d'administration incluent des suppositoires et quelquefois des formulations orales.

10 En général la concentration du polynucléotide dans la composition utilisée pour une administration *in vivo* est de 0.1µg /ml jusqu'à 20 mg /ml. Le polynucléotide peut être homologue ou hétérologue de la cellule cible dans laquelle il va être introduit.

La présente invention concerne également l'utilisation de vaccins incluant des molécules d'acides nucléiques qui codent pour les protéines d'intérêt ou des peptides immunogènes ou leur fragment(s), non actifs, correspondant aux protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Les vaccins d'acides nucléiques, en particulier les vaccins ADN, sont administrés généralement en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable en injection intramusculaire.

A partir de la séquence en acides aminés des protéines d'intérêt décrites (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17 et 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23,

SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, des peptides ou des fragments correspondant à tout ou partie de la séquence primaire de ces protéines peuvent être synthétisés par des méthodes classiques de synthèse peptidique ou obtenus par recombinaison génétique.

Des protéines recombinantes correspondante aux protéines d'intérêt, produites dans un système cellulaire procaryote ou eucaryote, sont disponibles auprès de différentes équipes et sont décrites dans la littérature. Elles peuvent être également produite par l'homme du métier à partir de la connaissance des séquences des gènes correspondants décrits dans la littérature et en tenant compte de la dégénérescence du code génétique. Toutes les séquences protéiques identifiées dans la présente invention sont ainsi susceptibles d'être obtenues par recombinaison génétique. Les gènes sont clonés dans des vecteurs adaptés. Des vecteurs différents sont utilisés pour transformer des cellules procaryotes (par exemple *E. coli*) et des cellules eucaryotes (par exemple cellules COS, CHO et cellules Simliki). Les protéines recombinantes correspondant aux protéines d'intérêt ou à des fragments des protéines d'intérêt peuvent être ainsi produits dans des systèmes cellulaires procaryotes et/ou encaryotes. Dans les cellules *E. coli*, les protéines recombinantes sont produites avec une queue poly-histidine. La fraction protéique insoluble est solubilisée dans de l'urée 8M. L'enrichissement du produit a été effectué sur résine chélatée au nickel (Qiagen). La colonne a été lavée avec des concentrations décroissantes d'urée. L'élution a été faite avec de l'imidazole en l'absence d'urée. La séquence complète des protéines d'intérêt peut être également clonée dans un plasmide adapté puis transférée dans le virus de la vaccine pour obtenir un virus recombinant.

Utilisation de ligands capables de se fixer aux protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, comprenant :

(i) soit au moins un ligand capable de se fixer aux protéines et/ou fragments des protéines choisies parmi les protéines cibles SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 14 et

24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, le ligand étant capable ou non d'inhiber l'activité protéique,

10 (ii) soit au moins un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins une protéine ou un de ses fragments choisie parmi les protéines cibles SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 14 et 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple 15 SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Cet 20 anticorps peut être ou non neutralisant, c'est-à-dire capable ou non d'inhiber l'activité de la protéine d'intérêt. Le ligand peut être choisi parmi toute molécule ou fragment molécule capable de se fixer aux protéines cibles, par exemple les récepteurs de ce protéines, les cofacteurs de ces protéines, les anticorps polyclonaux ou monoclonaux capables de se fixer aux protéines ou tout fragment de ces protéines.

25 Ces anticorps sont très utiles notamment pour permettent la mise en œuvre de compositions thérapeutiques car ils conduisent par exemple, à des réactions immunes, dirigées spécifiquement à l'encontre d'épitopes immunodominants ou contre des antigènes présentant une grande variabilité. On administre chez le patient soit des anticorps solubles neutralisants pour inhiber leur fonction, soit des anticorps solubles 30 spécifiques pour éliminer le peptide par formation de complexes immuns. L'invention décrit l'utilisation d'anticorps capables de reconnaître spécifiquement au moins une protéine décrite dans la présente invention pour le traitement et /ou pour le suivi

thérapeutique de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques. Ces anticorps sont polyclonaux et de préférence monoclonaux. De préférence ces anticorps reconnaissent le site actif de la protéine et en se fixant, inhibe la fonction de la protéine. La capacité de l'anticorps à se fixer spécifiquement à la protéine est analysé par des techniques conventionnelle décrites, comme par exemple par des tests ELISA ou de Western blot en utilisant la protéine ou le peptide immunogène naturel ou synthétique. Le titre de l'anticorps est déterminé. La capacité de l'anticorps à neutraliser la fonction de la protéine peut être analysée par différents moyen, par exemple en déterminant la diminution de l'activité de la protéine ou du peptide immunogène en présence de l'anticorps, de préférence en déterminant la diminution de l'activité gliotoxique en utilisant le test bio-essai *in vitro*.

Par exemple, les anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine cible ou une partie de cette protéine sont produits par des techniques conventionnelles utilisées pour produire des anticorps contre des antigènes de surface. Des souris ou des lapins sont immunisées (i) soit avec la protéine naturelle ou recombinante d'intérêt, (ii) soit avec tout peptide immunogène de cette protéine d'intérêt, (iii) soit avec des cellules murines qui expriment la protéine ou le peptide d'intérêt et les molécules du CMHII. La lignée murine Balb/c est la plus fréquemment utilisée. L'immunogène est également un peptide choisi parmi les peptides définis à partir des séquences primaires des protéines d'intérêt. Par exemple, l'immunogène suivant a été préparé : les peptides SEQ ID N°s 58, 59, 60 issus de la séquence du précurseur du ganglioside GM2, les peptides SEQ ID N°s 61, 62 issus de la séquence de la saposine B et les peptides SEQ ID N°s 63, 64, 65 issus de la calgranuline B ont été couplé à de l'hémocyanine de Lymphet Keyhole, en abrégé peptide-KLH, comme support pour son utilisation en immunisation, ou couplé à de l'albumine de sérique humaine, en abrégé peptide-HSA. Les animaux ont été soumis à une injection de peptide-KLH ou de peptide-HSA en utilisant de l'adjuvant complet de Freund (IFA). Les sérums et les surnageants de culture d'hybridome issus des animaux immunisés avec chaque peptide ont été analysés pour la présence d'anticorps anti-protéines par un test ELISA utilisant les protéines initiales. Les cellules spléniques de ces souris ont par conséquent été récupérées et fusionnées avec des cellules de myélome. Le polyéthylèneglycol (PEG) est l'agent de fusion le plus fréquemment utilisé. Les hybridomes produisant les

anticorps les plus spécifiques et les plus sensibles sont sélectionnés. Les anticorps monoclonaux peuvent être produits *in vitro* par culture cellulaire des hybridomes produits ou par récupération de liquide d'ascite murin après injection intrapéritonéale des hybridomes chez la souris. Quel que soit le mode de production en surnageant ou en ascite, il importe ensuite de purifier l'anticorps monoclonal. Les méthodes de purification utilisées sont essentiellement la filtration sur gel échangeur d'ions ou par chromatographie d'exclusion, voire l'immunoprécipitation. Pour chaque anticorps il faut choisir la méthode qui permettra d'obtenir le meilleur rendement. Un nombre suffisant d'anticorps anti-protéines sont criblés dans des tests fonctionnels pour identifier les anticorps les plus performants pour fixer la protéine d'intérêt et/ou pour bloquer l'activité de la protéine d'intérêt. Les anticorps monoclonaux sélectionnés sont humanisés par des méthodes standard de « CDR grafting » (protocole réalisé par de nombreuses compagnies, sous forme de service). Ces anticorps humanisés peuvent être testés cliniquement chez le patient. L'efficacité de ces anticorps peut être suivie par des paramètres cliniques.

La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps, tels que les anticorps chimères, produits par génie génétique, dans des cellules eucaryotes a été décrite (EP 120 694 ou EP 125 023) et est aussi applicable à la présente invention.

Utilisation de molécules inhibitrices des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, ladite composition comprenant (i) soit au moins une molécule inhibitrice de la fonction d'au moins une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au



moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, par exemple inhibitrice de l'activité gliotoxique, (ii) soit au moins une molécule régulatrice de l'expression d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, par exemple pour bloquer la transcription ou la traduction, (iii) soit au moins une molécule régulatrice du métabolisme d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, (iv) soit au moins une molécule régulatrice de l'expression et/ou du métabolisme d'un ligand d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29 et les séquences peptidiques qui présentent au

moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, par exemple un récepteur ou un cofacteur. On peut penser que ces protéines de l'organisme humain peuvent être inhibées sans effet secondaire.

5                   Un autre aspect important de l'invention concerne l'identification et l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de substances naturelles et/ou synthétiques (i) capables de bloquer et/ou d'inhiber l'activité des protéines d'intérêt de l'invention et/ou de leur fragment : SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies  
10 parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au  
15 moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29 et/ou (ii) capables d'inhiber leur métabolisme tels les inhibiteurs du métabolisme correspondant, les inhibiteurs d'enzymes activées par les coenzymes, (iii) capables de réguler l'expression des protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même  
20 famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 %  
25 d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, (iv) capables d'inhiber la fonction et/ou l'expression des ligands des protéines d'intérêt SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique  
30 de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences

peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, comme par exemple des récepteurs. Ces substances peuvent être utilisées dans des traitements prophylactiques et thérapeutiques de la maladie. L'invention concerne également des méthodes pour traiter et prévenir une maladie auto-immune, par exemple la SEP, en administrant des quantités effectives de ces substances. Les substances peuvent être des protéines, des anticorps, de petites molécules synthétiques ou naturelles, des dérivés des protéines identifiées dans cette invention, des lipides, des glycolipides etc... Les petites molécules peuvent être criblées et identifiées en grande quantité en utilisant des bibliothèques combinatoires chimiques. L'invention concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant ces substances en association avec des carriers physiologiques acceptables, et des méthodes pour la préparation de médicaments à utiliser en thérapie ou en prévention de maladies auto-immunes dont la SEP en utilisant ces substances.

Pour identifier des molécules inhibitrices de faible poids moléculaire comme des drogues candidates pour les maladies dégénératives et/ou neurologiques et/ou auto-immunes, telles que la sclérose en plaques, on utilise les tests et protocoles décrits dans précédemment et dans les demandes de brevet incorporés à titre de référence, en utilisant des échantillons prélevés du patient non traité ou traité, du modèle animal non traité ou traité, ou de tissus du modèle animal non traité ou traité. Cet aspect de l'invention inclue également un procédé pour identifier des substances capables de bloquer ou d'inhiber l'activité des protéines d'intérêt, comprenant l'introduction de ces substances dans un test *in vitro* ou dans un modèle animal *in vivo*. Les molécules sélectionnées sont testées à différentes concentrations. Ces inhibiteurs sont aussi testés dans des essais de toxicité et pharmacocinétique pour savoir si ils peuvent représenter des drogues candidates valables. Les substances testées pour l'inhibition ou le blocage des activités protéiques ou de l'expression des protéines, dans ces procédures de criblage peuvent être des protéines, des anticorps, des fragments d'anticorps, de petites molécules synthétiques ou naturelles, des dérivés des protéines d'intérêt, etc ..... Les petites molécules peuvent être criblées et identifiées en grande quantité en utilisant des bibliothèques combinatoires chimiques.

A titre d'exemple, on peut citer comme substances inhibitrices :

Les inhibiteurs des protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24), les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les inhibiteurs des fragments desdites protéines. Ces inhibiteurs peuvent être compris dans une composition prophylactique et thérapeutique, en particulier pour le traitement de la sclérose en plaques. Par exemple, la lycorine, alcaloïde extrait de Amaryllidaceae (ex : *Crinum Asiaticum*) est utilisée *in vitro* à une concentration comprise entre 0.1 et 0.5 µg /ml et *in vivo* à une concentration comprise entre 0.1 et 1 mg / kg /jour. Par exemple, le Rolipram (nom commercial) et l'Ibudilast (nom commercial), qui sont deux molécules de la même famille des inhibiteurs des phosphodiesterases 4(PDE4) sont utilisées *in vitro* à des concentrations comprises entre 1 et 10 µM/l et *in vivo* à des concentrations comprises entre environ 10 mg/kg/jour.

☛ A partir des séquences d'acides aminés des protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et des séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29), il est évident que l'on peut déduire les séquences nucléotidiques ADN et ARN (SEQ ID N° 30, 31, 42, 53) correspondant aux protéines d'intérêt et les séquences codant pour les protéines de la famille de ces protéines d'intérêt ( par exemple SEQ ID N° 32 à 41, SEQ ID N° 43 à 52, SEQ ID N° 54 à 57, SEQ ID N° 66 à 67), en tenant compte du code génétique et de sa dégénérescence. Ainsi la présente invention concerne l'utilisation de ces séquences nucléotidiques sous forme :

- de séquences anti-sens,
- de séquences codant pour un gène thérapeutique,

- de séquences pouvant être contenue dans un vecteur pour la réalisation de transformation cellulaire ex vitro et/ou in vivo (thérapie génique).

Utilisation d'acides nucléiques déduits des séquences en acides aminés des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention ; acides nucléiques anti-sens et/ou codant pour un gène thérapeutique.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, en particulier la sclérose en plaques, la composition comprenant (i) soit au moins une séquence d'acide nucléique capable de s'hybrider à une séquence d'acides nucléiques codant pour les protéines d'intérêt (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s), (ii) soit au moins une séquence d'acide nucléique comprenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique codant pour les protéines ou un fragment de protéines (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24), les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et des éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* dans des cellules cibles destinées à être génétiquement modifiées par ladite séquence nucléique.

Par séquence d'acide nucléique, on entend un fragment d'ADN et/ou d'ARN, double brin ou simple brin, linéaire ou circulaire, naturel et isolé ou de

synthèse, désignant un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique choisi dans le groupe consistant en un ADNc ; un ADN génomique ; un ADN plasmidique ; un ARN messenger. Ces séquences d'acides nucléiques sont déduites de la séquence d'acides aminés des protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, en utilisant le code génétique. En raison de la dégénérescence du code génétique l'invention englobe également des séquences équivalentes ou homologues. Ces séquences définies permettent à l'homme de l'art de définir lui-même les acides nucléiques adaptés.

Aussi, la présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques comprenant au moins une séquence d'acide nucléique capable de s'hybrider à une séquence d'acides nucléiques codant pour les protéines d'intérêt ou leur(s) fragment(s) (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

L'invention consiste à définir et utiliser des molécules d'acides nucléiques complémentaires des séquences ADN et/ou ARN codant pour les protéines d'intérêt ou leur(s) fragment(s). Ces fragments correspondent à des molécules anti-sens ou ribozyme et peuvent être synthétisés à l'aide de synthétiseurs automatiques, tels que

ceux commercialisés par la société Applied Biosystem. L'invention décrit l'utilisation de ces acides nucléiques capables de s'hybrider dans des conditions stringentes à l'ADN ou/et ARN codant pour les protéines de l'invention ou pour leu(s) fragment(s). Des conditions de stringence caractéristiques sont celles qui correspondent à une  
5 combinaison de la température et de la concentration saline choisie approximativement entre 12 à 20°C sous le T<sub>m</sub> (« melting temperature ») de l'hybride à l'étude. De telles molécules sont synthétisées et peuvent être marquées en utilisant des méthodes de marquage conventionnelles utilisées pour les sondes moléculaires, ou peuvent être utilisées comme amorces dans les réactions d'amplification. Les séquences qui  
10 présentent au moins 90% d'homologie par rapport à une séquence de référence font également partie de l'invention, de même que les fragments de ces séquences qui présentent au moins 20 nucléotides et de préférence 30 nucléotides contigus homologues par rapport à une séquence de référence. Afin de réduire la proportion de peptides naturels ou variants, il est possible d'envisager une approche anti-sens et/ou  
15 ribozyme. Une telle approche est largement décrite dans la littérature. Bien entendu, de telles molécules anti-sens peuvent constituer en tant que telles des vecteurs. On peut également utiliser des vecteurs qui comprennent une séquence d'acides nucléique qui code pour un anti-sens.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation  
20 de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de mammifères atteint de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, ladite composition comprenant au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* dans des cellules cibles destinées à être génétiquement  
25 modifiées par ladite séquence nucléique.

Ces séquences d'acides nucléiques et/ou vecteurs (anti-sens ou codant pour une protéine ou un fragment d'une protéine) permettent de cibler les cellules dans lesquelles le peptide est exprimé, telles que les cellules macrophages : (i) soit par l'utilisation d'une molécule de ciblage introduite sur le vecteur, (ii) soit par l'utilisation  
30 d'une propriété particulière de ces cellules.

Utilisation de vecteurs comprenant un gène d'intérêt thérapeutique correspondant aux gènes des protéine d'intérêt identifiées dans la présente invention.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à la prévention et au traitement de maladies dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telles que la sclérose en plaques, la composition comprenant une séquence d'acide nucléique comprenant un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments d'expression dudit gène d'intérêt. Les gènes peuvent être non mutés ou mutés. Ils peuvent également consister en des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome de la cellule cible ou des acides nucléiques stabilisés à l'aide d'agents, tels que la spermine.

Un tel gène d'intérêt thérapeutique code notamment :

(i) soit au moins pour une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s),

(ii) soit au moins pour tout ou partie d'un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins une protéine ou un fragment de protéine choisi parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Il peut notamment s'agir d'anticorps transmembranaire natif, ou de fragment ou dérivé d'un tel anticorps, pour autant que



ledit anticorps, fragment ou dérivé d'anticorps soit exprimé à la surface de la cellule cible du mammifère génétiquement modifiée et soit capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique ou d'un lymphocyte T helper impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule,

5 (iii) soit au moins pour une molécule inhibitrice d'au moins une protéine ou de ses fragments, ladite protéine étant choisie parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de  
10 l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29; les  
15 protéines inhibitrices de la fonction et/ou du métabolisme et/ou de la fixation des protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par  
20 exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29,

(iv) soit au moins pour un ligand ou toute partie d'un ligand capable de se  
25 fixer à au moins une protéine ou un fragment de protéine choisi parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par  
30 exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 %

d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et/ou d'inhiber sa fonction.

Plus particulièrement, par fragment d'anticorps, on entend les fragments F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, sFv (Blazar et al., 1997, Journal of Immunology 159 : 5821-5833 ;  
5 Bird et al., 1988 Science 242 : 423-426) d'un anticorps natif et par dérivé on entend, par exemple, un dérivé chimérique d'un tel anticorps (voir par exemple les chimères des anticorps antiCD3 Souris/Homme dans Arakawa et al., 1996 J Biochem 120 : 657-662 ou les immunotoxines telles que sFv-toxine de Chaudary et al 1989, Nature 339 : 394-397). Par anticorps transmembranaire on entend un anticorps dont au moins la  
10 région fonctionnelle capable de reconnaître et de se fixer à son antigène spécifique est exprimée à la surface des cellules cibles pour permettre lesdites reconnaissance et fixation. Plus particulièrement, les anticorps selon la présente invention consistent en des polypeptides de fusion comprenant les amino acides définissant ladite région fonctionnelle et une séquence d'acides aminés (polypeptide transmembranaire)  
15 permettant l'ancrage au sein de la double couche lipidique membranaire de la cellule cible ou à la surface externe de cette bi-couche. Les séquences nucléiques codant pour de nombreux polypeptides transmembranaires sont décrites dans la littérature. Selon un cas tout à fait avantageux, la séquence d'acide nucléique codant pour la chaîne lourde de l'anticorps est fusionnée avec la séquence d'acide nucléique codant pour un dit  
20 polypeptide transmembranaire.

Par éléments assurant l'expression dudit gène *in vivo* on fait notamment référence aux éléments nécessaires pour assurer l'expression dudit gène après son transfert dans une cellule cible. Il s'agit notamment des séquences promotrices et/ou des séquences de régulation efficaces dans ladite cellule, et éventuellement les  
25 séquences requises pour permettre l'expression à la surface des cellules cibles dudit polypeptide. Le promoteur utilisé peut être un promoteur viral, ubiquitaire ou spécifique de tissu ou encore un promoteur synthétique. A titre d'exemple, on mentionnera les promoteurs tels que les promoteurs des virus RSV (Rous Sarcoma Virus), MPSV, SV40 (Simian Virus), CMV (Cytomegalovirus) ou du virus de la  
30 vaccine, les promoteurs du gène codant pour la créatine kinase musculaire, pour l'actine. Il est en outre possible de choisir une séquence promotrice spécifique d'un

type cellulaire donné, ou activable dans des conditions définies. La littérature procure un grand nombre d'informations relatives à de telles séquences promotrices.

Par ailleurs, ledit acide nucléique peut comprendre au moins deux séquences, identiques ou différentes, présentant une activité de promoteur transcriptionnel et/ou au moins deux gènes, identiques ou différents, situés l'un par rapport à l'autre de manière contiguë, éloignée, dans le même sens ou dans le sens inverse, pour autant que la fonction de promoteur transcriptionnel ou la transcription desdits gènes ne soit pas affectée.

De même dans ce type de construction d'acide nucléique, il est possible d'introduire des séquences nucléiques « neutres » ou introns qui ne nuisent pas à la transcription et sont épissées avant l'étape de traduction. De telles séquences et leurs utilisations sont décrites dans la littérature (référence : demande de brevet PCT WO 94/29471).

Ledit acide nucléique peut également comprendre des séquences requises pour le transport intracellulaire, pour la réplication et/ou pour l'intégration, pour la transcription et/ou la traduction. De telles séquences sont bien connues de l'homme de l'art.

Par ailleurs, les acides nucléiques utilisables selon la présente invention peuvent également être des acides nucléiques modifiés de sorte qu'il ne leur est pas possible de s'intégrer dans le génome de la cellule cible ou des acides nucléiques stabilisés à l'aide d'agents, tels que par exemple la spermine, qui en tant que tels n'ont pas d'effet sur l'efficacité de la transfection.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la séquence d'acide nucléique est une séquence d'ADN ou ARN nue, c'est à dire libre de tout composé facilitant son introduction dans les cellules (transfert de séquence d'acide nucléique). Toutefois, selon un second mode de réalisation de l'invention, afin de favoriser son introduction dans les cellules cibles et afin d'obtenir les cellules génétiquement modifiées de l'invention, cette séquence d'acide nucléique peut être sous la forme d'un « vecteur », et plus particulièrement sous la forme d'un vecteur viral, tel que par exemple un vecteur adénoviral, rétroviral, un vecteur dérivé d'un poxvirus, notamment dérivé du virus de la vaccine ou du Modified Virus Ankara (MVA) ou d'un vecteur non viral tel que, par exemple, un vecteur consistant en au moins une dite séquence d'acide

nucléique complexée ou conjuguée à au moins une molécule ou substance porteuse sélectionnée parmi le groupe consistant en un amphiphile cationique, notamment un lipide cationique, un polymère cationique ou neutre, un composé polaire pratique notamment choisi parmi le propylène glycol, le polyéthylène glycol, le glycérol, l'éthanol, la 1-méthyl L-2-pyrrolidone ou leurs dérivés, et un composé polaire aprotique notamment choisi parmi le diméthylsulfoxyde (DMSO), le diéthylsulfoxyde, le di-n-propylsulfoxyde, le diméthylsulfone, le sulfolane, la diméthylformamide, le diméthylacetamide, la tetraméthylurée, l'acétonitrile ou leurs dérivés. La littérature procure un nombre important d'exemples de tels vecteurs viraux et non viraux.

De tels vecteurs peuvent en outre et de préférence comprendre des éléments de ciblage pouvant permettre de diriger le transfert de séquence d'acide nucléique vers certains types cellulaires ou certains tissus particuliers tels que les cellules cytotoxiques et les cellules présentatrices de l'antigène). Ils peuvent également permettre de diriger le transfert d'une substance active vers certains compartiments intracellulaires préférés tel que le noyau, les mitochondries ou les peroxysomes, par exemple. Il peut en outre s'agir d'éléments facilitant la pénétration à l'intérieur de la cellule ou la lyse de compartiments intracellulaires. De tels éléments de ciblage sont largement décrits dans la littérature. Il peut par exemple s'agir de tout ou partie de lectines, de peptides, notamment le peptide JTS-1 (voir demande de brevet PCT WO 94/40958), d'oligonucléotides, de lipides, d'hormones, de vitamines, d'antigènes, d'anticorps, de ligands spécifiques de récepteurs membranaires, de ligands susceptibles de réagir avec un anti-ligand, de peptides fusogènes, de peptides de localisation nucléaire, ou d'une composition de tels composés.

Utilisation de cellules transformées *in vivo* après injection de vecteurs contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique défini à partir des protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 %

d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinée à la prévention et au traitement de mammifères atteint de maladies dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, la composition comprenant au moins un vecteur contenant un gène thérapeutique comme décrit ci-dessous, capable d'être introduit dans une cellule cible *in vivo* et d'exprimer le gène d'intérêt thérapeutique *in vivo*. L'avantage de cette invention repose sur la possibilité de maintenir sur le long terme un niveau basal de molécules exprimées dans le patient traité. Des vecteurs ou acides nucléiques codant pour des gènes d'intérêt thérapeutique sont injectés. Ces vecteurs et acides nucléiques doivent être transportés jusqu'aux cellules cibles et transfecter ces cellules dans lesquelles ils doivent être exprimés *in vivo*.

L'invention concerne l'expression *in vivo* de séquences nucléotidiques et/ou de vecteurs tels que désignés dans le paragraphe précédent, c'est-à-dire des séquences correspondant à des gènes d'intérêt thérapeutique codant notamment :

(i) soit au moins pour une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, ou leur(s) fragment(s),

(i) soit au moins pour tout ou partie d'un anticorps polyclonal ou monoclonal capable de se fixer à au moins une protéine choisie parmi les protéines identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la

calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une  
5 quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Il peut s'agir d'anticorps transmembranaire natif, ou de fragment ou dérivé d'un tel anticorps, pour autant que ledit anticorps, fragment ou dérivé d'anticorps soit exprimé à la surface de la cellule cible de mammifère génétiquement modifiée et en ce que ledit anticorps est capable de se fixer à un polypeptide présent à la surface d'une cellule effectrice cytotoxique  
10 ou d'un lymphocyte T helper et impliqué dans le procédé d'activation d'une telle cellule. Il peut s'agir de fragments d'anticorps exprimés par des cellules capables de sécréter lesdits anticorps dans la circulation sanguine d'un mammifère ou patient porteur des cellules génétiquement modifiées par le gène codant pour l'anticorps,

(ii) soit au moins pour une molécule inhibitrice d'au moins une  
15 protéine choisie parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3,  
20 SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29; protéine inhibitrice de la fonction et/ou du métabolisme et/ou de la fixation des protéines SEQ ID N° 2, 4,  
25 8,9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID  
30 N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement

au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29,

(iii) soit au moins pour un ligand ou toute partie du ligand capable de se fixer sur au moins une protéine choisie parmi les protéines identifiées (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et/ou d'inhiber sa fonction.

Selon un mode de réalisation particulier, il s'agit d'utiliser la thérapie génique de manière à diriger la réponse immune contre la protéine, le peptide ou la molécule d'intérêt cible, c'est-à-dire contre toute protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, leur(s) fragment(s) et/ou contre toute molécule inhibitrice de la fonction et/ou de l'expression et/ou du métabolisme desdites protéines d'intérêt, et/ou des ligands desdites protéines comme par exemple les récepteurs. Pour cela il est évident que les cellules à cibler pour la transformation avec un vecteur sont des cellules appartenant au système immunitaire, soit des cellules de type lymphocytes (CD4/CD8), soit des cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques, macrophages, ...).

Selon un mode de réalisation particulier, on modifie génétiquement, notamment *in vivo*, les cellules présentatrices de l'antigène (CPA). Les CPA comme les

macrophages, les cellules dendritiques, les microgliocytes, les astrocytes jouent un rôle dans l'initiation de la réponse immunitaire. Elles sont les premiers composants cellulaires qui capturent l'antigène, l'apprête dans la cellule et expriment des molécules du CMHI et CMHII transmembranaires impliquées dans la présentation de l'immunogène aux  
5 cellules T CD4+ et CD8+, elles produisent des protéines accessoires spécifiques qui participent à l'activation des cellules T (Debrick et al., 1991, J. Immunol 147 : 2846 ; Reis et al., 1993, J Ep Med 178 : 509 ; Kovacsovics-bankowski et al., 1993, PNAS 90 : 4942 ; Kovacsovics-bankowski et al., 1995 Science 267 : 243 ; Svensson et al., 1997, J Immunol 158 : 4229 ; Norbury et al., 1997, Eur J Immunol 27 : 280). Pour une  
10 vaccination, il peut être avantageux de disposer d'un système de thérapie génique qui peut cibler le transfert de gène dans de telles cellules APC, c'est-à-dire un gène qui code pour un polypeptide qui peut, après sa production intracellulaire et son « processing », être présenté aux cellules CD8+ et/ou CD4+ par les molécules des complexes CMHI et CMHII respectivement à la surface de ces cellules.

15 On choisit d'exprimer à la surface des cellules CPA *in vivo* tout ou partie d'un anticorps et/ou d'un ligand comme par exemple un récepteur, capable de réagir avec la protéine ou le peptide cible choisis parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine  
20 plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des  
25 séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. De telles cellules vont alors spécifiquement phagocyter ladite protéine ou ledit peptide, le « processer » de façon à ce que des fragments de ce peptide soient présentés à la surface des cellules présentatrices de l'antigène.

La littérature propose un grand nombre d'exemples de gènes codant pour  
30 des anticorps capables de réagir avec des polypeptides ou récepteurs. Il est à la portée de l'homme de l'art d'obtenir les séquences d'acides nucléiques codant pour de tels anticorps. Citons par exemple les gènes codant pour les chaînes légère et lourde de



l'anticorps YTH 12.5 (anti-CD3) (Routledge et al. 1991, Eur J Immunol 21 : 2717-2725), de l'anti-CD3 selon Arakawa et al ; 1996, J. Biochem. 120 : 657-662. Les séquences d'acide nucléique de tels anticorps sont aisément identifiables à partir des bases de données communément utilisées par l'homme du métier. Il est également possible à partir d'hybridomes disponibles auprès de l'ATCC de cloner les séquences d'acides nucléiques codant pour les chaînes lourdes et/ou légères de ces différents anticorps par les méthodes d'amplification telles que la RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques ou les techniques mettant en œuvre des banques d'ADNc (Maniatis et al., 1982, Molecular cloning. A laboratory manual CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Les séquences ainsi clonées sont alors disponibles pour leur clonage dans des vecteurs. Selon un cas préféré de l'invention, la séquence d'acide nucléique codant pour la chaîne lourde de l'anticorps est fusionnée par recombinaison homologue avec la séquence d'acide nucléique codant pour un polypeptide transmembranaire tel que la glycoprotéine rabique ou la gp160 (Polydefkis et al., 1990, J Exp Med 171 : 875-887). Ces techniques de biologie moléculaire ont été parfaitement bien décrites.

On choisit d'exprimer à la surface des cellules CPA *in vivo* des fragments immunogènes correspondant à au moins une protéines choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmétique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29. Pour cela, on peut choisir de faire exprimer par le vecteur soit le polypeptide complet soit de manière préférée des polypeptides sélectionnés pour réagir avec des ligands et/ou récepteurs spécifiques. Le peptide immunogène codé par le polynucléotide introduit dans la cellule du vertébré *in vivo* peut être produit et/ou sécrété, apprêté puis présenté à une cellule présentatrice de l'antigène (APC) dans le contexte des molécules du CMH. Les APC ainsi transférées *in vivo* induisent une réponse immune dirigée contre

l'immunogène exprimé *in vivo*. Les APC possèdent différents mécanismes pour capturer les antigènes : (a) la capture des antigènes par des récepteurs membranaires comme les récepteurs aux immunoglobulines (Fc) ou pour le complément disponibles à la surface des granulocytes, des monocytes ou macrophages permettant une délivrance efficace de l'antigène dans les compartiments intracellulaires après phagocytose médiée par les récepteurs. (b) l'entrée dans les APC par pinocytose en phase fluide, impliquant différents mécanismes : la micropinocytose c'est-à-dire la capture de petites vésicules (0.1 µm) par les puits recouverts de clathrine et la macropinocytose c'est-à-dire la capture de plus grosses vésicules (avec une taille variant entre 0.5 µm et environ 6 µm) (Sallusto et al. 1995, J Exp Med 182 : 389-400). Tandis que la micropinocytose existe de façon constitutive dans toutes les cellules, la macropinocytose est limitée à des types cellulaires, comme par exemple les macrophages, les cellules dendritiques, les astrocytes, les cellules épithéliales stimulées par des facteurs de croissance (Racoosin et al., J Cell Sci 1992, 102 : 867-880). Dans cette invention, on entend par cellules capables de macropinocytose, les cellules qui peuvent réaliser les événements décrits ci-dessus et les cellules qui peuvent capturer des macromolécules de préférence entre 0.5 µm et environ 6 µm dans le cytoplasme.

Selon un mode de réalisation particulier, on modifie génétiquement notamment *in vivo*, les cellules effectrices cytotoxiques ou les lymphocytes T helper de façon à ce qu'elles expriment à leur surface un polypeptide correspondant aux protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, à des ligands desdites protéines, naturellement non exprimés par ces cellules, et capables d'induire le procédé d'activation de telles cellules, par l'introduction dans ces cellules de séquences d'acide nucléique renfermant le gène codant pour un tel polypeptide. Conformément à la présente invention, il est également possible de sélectionner une

séquence d'acide nucléique contenant un gène d'intérêt thérapeutique codant pour tout ou partie d'un anticorps dirigé contre une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, susceptible d'être exprimé à la surface des cellules cibles du patient à traiter, ledit anticorps étant capable de se fixer à un polypeptide naturellement non exprimé par ces cellules effectrices cytotoxiques ou lymphocytes T helper.

Par cellules effectrices cytotoxiques, on entend désigner les macrophages, les astrocytes, les lymphocytes T cytotoxiques (TCL) et les cellules tueuses (NK) ainsi que leurs dérivés telles que par exemple les LAK (Versteeg 1992 Immunology today 13 : 244-247 ;Brittende et al 1996, Cancer 77 :1226-1243). Par 'lymphocytes T helper' on entend désigner notamment les CD4 qui permettent après activation la sécrétion de facteurs d'activation des cellules effectrices de la réponse immune. Les polypeptides et notamment les récepteurs exprimés à la surface de ces cellules et qui sont impliqués dans l'activation de telles cellules consistent notamment en tout ou partie du complexe TCR ou le CD3, tout ou partie des complexes CD8, CD4, CD28, LFA-1, 4-1BB (Melero et al., 1998, Eur J Immunol 28 : 1116-1121), CD47, CD2, CD1, CD9, CD45, CD30, CD40, tout ou partie des récepteurs de cytokines (Finke et al., 1998, Gene therapy 5 : 31-39), telles que IL-7, IL-4, IL-2, IL-15 ou GM-CSF, tout ou partie du complexe récepteur des cellules NK tel que par exemple NKAR, Nkp46, .. ; (Kawano et al., 1998 Immunology 95 :5690-5693 ; Pessino et al., 1998 J Exp Med188 :953-960), Nkp44, tout ou partie des récepteurs de macrophages tels que par exemple le récepteur Fc (Deo et al., 1997, Immunology Today 18 : 127-135).

De nombreux outils ont été développés pour introduire différents gènes hétérologues et/ou vecteurs dans des cellules, en particulier des cellules de mammifères. Ces techniques peuvent être divisées en deux catégories : la première

catégorie implique des technique physiques comme la micro-injection, l'électroporation ou le bombardement de particules. La seconde catégorie est basée sur l'utilisation de techniques en biologie moléculaire et cellulaire avec lesquelles le gène est transféré avec un vecteur biologique ou synthétique qui facilite l'introduction du matériel dans la cellule *in vivo*. Aujourd'hui, les vecteurs les plus efficaces sont les vecteurs viraux en particulier les adénoviraux et rétroviraux. Ces virus possèdent des propriétés naturelles pour traverser les membranes plasmiques, éviter la dégradation de leur matériel génétique et introduire leur génome dans le noyau de la cellule. Ces virus ont été largement étudiés et certains sont déjà utilisés expérimentalement dans des applications humaines en vaccination, en immunothérapie, ou pour compenser des déficiences génétiques. Cependant cette approche virale a des limitations notamment due à la capacité de clonage restreinte dans ces génomes viraux, le risque de disséminer les particules virales produites dans l'organisme et l'environnement, le risque de mutagenèse artéfactuelle par insertion dans la cellule hôte dans le cas des rétrovirus, et la possibilité d'induire une forte réponse immune inflammatoire *in vivo* pendant le traitement, ce qui limite le nombre d'injections possibles (Mc Coy et al. 1995, Human Gene Therapy 6 : 1553-1560 ; Yang et al., 1996 Immunity 1 : 433-422). D'autres systèmes alternatifs à ces vecteurs viraux existent. L'utilisation de méthodes non virales comme par exemple la co-précipitation avec le phosphate de calcium, l'utilisation de récepteurs qui miment les systèmes viraux (pour un résumé voir Cotten et Wagner 1993, Current Opinion in Biotechnology, 4 : 705-710), ou l'utilisation de polymères comme les polyamidoamines (Haensler et Szoka 1993, Bioconjugate Chem 4 : 372-379). D'autres techniques non virales sont basées sur l'utilisation de liposomes dont l'efficacité pour l'introduction de macromolécules biologiques comme l'ADN, l'ARN des protéines ou des substances pharmaceutiques actives a été largement décrite dans la littérature scientifique. Dans ce domaine des équipes ont proposé l'utilisation de lipides cationiques ayant une forte affinité pour les membranes cellulaires et/ou les acides nucléiques. En fait, il a été montré qu'une molécule d'acide nucléique elle-même pouvait traverser la membrane plasmique de certaines cellules *in vivo* (WO 90/11092), l'efficacité étant dépendante en particulier de la nature polyanionique de l'acide nucléique. Dès 1989 (Felgner et al., Nature 337 : 387-388) les lipides cationiques ont été proposés pour faciliter l'introduction de larges molécules

anioniques, ce qui neutralise les charges négatives de ces molécules et favorise leur introduction dans les cellules. Différentes équipes ont développés de tels lipides cationiques : le DOTMA ( Felgner et al., 1987, PNAS 84 : 7413-7417), le DOGS ou Transfectam™ (Behr et al., 1989, PNAS 86 : 6982-6986), le DMRIE et le DORIE (Felgner et al., 1993 methods 5 : 67-75), le DC-CHOL (Gao et Huang 1991, BBRC 179 : 280-285), le DOTAP™ (McLachlan et al., 1995, Gene therapy 2 : 674-622) ou la Lipofectamine™, et les autres molécules décrites dans les brevets WO9116024, WO9514651, WO9405624. D'autres groupes ont développés des polymères cationiques qui facilitent le transfert de macromolécules en particulier des macromolécules anioniques dans les cellules. Le brevet WO95/24221 décrit l'utilisation de polymères dendritiques, le document WO96/02655 décrit l'utilisation du polyéthylèneimine ou polypropylèneimine et les document US-A-5595897 et FR 2719316, l'utilisation des conjugués polylysine.

Etant donné que l'on souhaite obtenir *in vivo* une transformation ciblée vers un type cellulaire donné, il est évident que le vecteur utilisé doit pouvoir être lui-même « ciblé », comme décrit ci dessus.

Utilisation de cellules transformées *in vitro* ou *ex vivo* avec des vecteurs contenant un gène d'intérêt thérapeutique défini par rapport aux protéines d'intérêt identifiées dans la présente invention (SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24) et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

La présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinée à la prévention et au traitement de maladies dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de préférence la sclérose en plaques, la composition comprenant au moins une cellule, notamment une cellule ne produisant pas naturellement des anticorps, sous une forme permettant leur

administration dans l'organisme d'un mammifère, humain ou animal, ainsi qu'éventuellement leur culture préalable, ladite cellule étant génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène codant *in vivo* pour :

5 (i) au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par  
10 exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID  
15 N° 1 à 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et tout fragment

(ii) au moins un peptide défini à partir de la séquence primaire d'au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les  
20 séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatiche de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et  
25 les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29,

(iii) au moins toute molécule inhibitrice de la fonction et/ou de la fixation et/ou de l'expression de ces protéines,

30 (iv) au moins un peptide issu de la séquence primaire d'une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de

protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et capable de se fixer sur au moins une glycoprotéine du CMHI,

(v) au moins tout anticorps et toute partie d'anticorps capables de se fixer à au moins une protéine choisie parmi les protéines SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B (par exemple SEQ ID N°1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 à 7, SEQ ID N° 10 à 16, SEQ ID N° 18 à 23, SEQ ID N° 25 à 29) et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29.

Plus particulièrement, ladite cellule cible provient soit du mammifère à traiter, soit d'un autre mammifère que celui à traiter. Dans ce dernier cas, il convient de noter que ladite cellule cible aura subi un traitement la rendant compatible avec le mammifère à traiter. Par « mammifère » on entend, de préférence, un mammifère humain. Ces cellules sont établies en lignées cellulaires et sont préférentiellement CMHII<sup>+</sup> ou CMHII<sup>+</sup>-inductibles comme les lymphocytes, les monocytes, les astrocytes, les oligodendrocytes.

L'invention concerne également les cellules modifiées et un procédé de préparation d'une cellule telle que décrite ci dessus caractérisé en ce que l'on introduit dans une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement d'anticorps, par tout moyen approprié, au moins une séquence d'acide nucléique contenant au moins un gène d'intérêt thérapeutique et des éléments assurant l'expression dudit gène dans ladite cellule, ledit gène d'intérêt thérapeutique contenant une séquence d'acide nucléique codant pour une molécule ou un fragment de molécule *in vivo*, comme décrit

juste ci-dessus. Plus particulièrement, elle concerne des cellules procaryotes, des cellules de levure et des cellules animales, en particulier des cellules de mammifères transformées par au moins une séquence nucléotidique et/ou un vecteur tel que décrit précédemment.

5            Selon un mode de réalisation particulier, les cellules (cellules dendritiques, macrophages, astrocytes, lymphocytes T CD4+, lymphocytes T CD8+, ..... ) du patient ou allogéniques sont placées en contact d'une préparation purifiée du polypeptide cible, celui-ci étant internalisé, apprêté et présenté à la surface cellulaire associée aux molécules du CMHI et/ou CMHII et ainsi induire une réponse immunitaire  
10 spécifique contre le peptide. Les cellules « activées » sont ensuite administrées au patient chez lequel elles vont induire une réponse immunitaire spécifique des antigènes (on utilise une voie naturelle de la réponse immunitaire, mais on contrôle ce que la cellule présentatrice de l'antigène va présenter)

             Selon un mode de réalisation particulier, les cellules présentatrices  
15 d'antigène (cellule dendritique, macrophage, astrocytes,..) sont modifiées *in vitro* pour exprimer les antigènes dans la cellule transformée qui vont s'associer aux molécules du CMHI et/ou CMHII et être présentées à la surface des cellules pour induire chez le patient chez lequel on administre la cellule modifiée une réaction immunitaire parfaitement ciblée.

20            Toutes les approches vaccinales ne sont pas toujours satisfaisantes et conduisent par exemple à des réactions immunitaires limitées dirigées uniquement à l'encontre d'épitopes immunodominants ou contre des antigènes présentant une grande variabilité. De même la présentation incorrecte des antigènes par les glycoprotéines du système CMH à la surface des cellules, ne permet pas de développer chez le patient  
25 traité une immunité anti-protéine d'intérêt convenable. Afin de pallier ces problèmes, certains auteurs ont proposé dans le cadre de tels procédés vaccinaux, de sélectionner les fragments minimaux antigéniques correspondant aux portions de peptide susceptibles d'être reconnus spécifiquement par les lymphocytes T cytotoxiques, de les exprimer dans les cellules afin qu'ils s'associent aux molécules du CMHI et soient  
30 présentés à la surface des cellules pour induire chez le patient traité une réaction immunitaire parfaitement ciblée (Toes et al. 1997, PNAS 94 : 14660-14665). Plus particulièrement, il a été montré que des épitopes de très petites tailles (variant de 7 à



environ 13 acides aminés) qui sont exprimés à partir de minigènes introduits dans un virus de la vaccine, pouvaient induire une immunisation de type cellulaire. Il a par ailleurs été montré que plusieurs minigènes pouvaient être exprimés conjointement à partir d'un même vecteur (cette construction particulière est appelée « string of beads »). Une telle construction présente l'avantage d'induire une réaction immune de type CTL synergique (Whitton et al., 1993 J. of Virology 67 : 348-352).

Protocole de mise en contact des cellules et du fragment antigénique :

La présentation des fragments antigéniques par les molécules CMHI repose sur un procédé intracellulaire identifié (voir Groettrup et al., 1996 Immunology Today 17 : 429-435 pour une revue) au cours duquel des peptides antigéniques de très courtes tailles (environ 7-13 acides aminés) sont produits par dégradation d'un polypeptide plus complexe contre lequel la réaction immune finale sera dirigée. Ces courts peptides sont ensuite associés aux molécules du CMHI ou du CMHII pour former un complexe protéique qui est transporté à la surface cellulaire afin de présenter lesdits peptides aux lymphocytes T cytotoxiques circulants ou aux lymphocytes T helper circulants, respectivement. Il convient en outre de noter que la spécificité des molécules CMH I ou CMH II vis-à-vis des peptides antigéniques varie en fonction des molécules CMH I ou CMH II (exemple pour le CMHI : HLA-A, HLA-B, ...) et de l'allèle (exemple pour le CMH I : HLA-A2, HLA-A3, HLA-A11) considérés. Au sein d'une même espèce animale, d'un individu à l'autre, il existe une grande variabilité des gènes codant pour les molécules du système CMH (à ce sujet, voir notamment George et al., 1995, Immunology Today 16 : 209-212).

Selon un mode de réalisation particulier, les cellules, telles que les cellules dendritiques, les macrophages, les astrocytes, les lymphocytes T CD4+, les lymphocytes T CD8+, sont modifiées de manière à exprimer à leur surface des anticorps spécifiques du peptide ciblé. Le peptide est neutralisé par les anticorps exprimés à la surface des cellules. Ces cellules sont de préférence immunes, de préférence du patient, de préférence cytotoxiques, modifiées pour exprimer tout ou partie d'un anticorps spécifique du polypeptide cible.

Isolement de cellules mononucléées à partir de sang périphérique :

En 1968, Boyum décrit une technique rapide qui permet par centrifugation du sang sur gradient de densité, de séparer les cellules mononucléées

(lymphocytes et monocytes) avec un bon rendement (rendement théorique 50 %, c'est-à-dire  $10^6$  cellules /ml de sang). 50 ml de sang périphérique prélevés stérilement dans des tubes héparinés sont centrifugés 20 minutes à 150g à 20°C. Les cellules récupérées sont diluées dans deux volumes de sang périphérique initial de PBS stérile. 10 ml de  
5 cette suspension sont déposés sur 3ml d'une solution de Ficoll-Hypaque (milieu de séparation des lymphocytes, Flow). Après centrifugation pendant 20 minutes à 400g et 20°C sans freinage de décélération, les cellules mononucléées sédimentent à l'interface PBS-Ficoll, en une couche dense, opalescente, alors que la quasi-totalité des globules rouges et des polynucléaires sédimentent au fond du tube. Les cellules  
10 mononucléées sont récupérées et lavées en PBS stérile.

Internalisation des antigènes par les cellules présentatrices de l'antigène :

Traitement préalable des cellules présentatrices de l'antigène : les cellules présentatrices de l'antigène sont préalablement lavées avec un tampon PBS-BSA à 0.5% (p/v) puis énumérées puis elle sont préincubées en présence de différents  
15 inhibiteurs de réduction trois fois en PBS-BSA 0.5% contenant de 10  $\mu$ M à 10 mM final de DTNB (acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque) ou de NEM (N-éthylmaléimide). Les étapes ultérieures de fixation d'antigènes à la surface cellulaire ou d'internalisation d'antigènes se réalisent aussi en présence des différentes concentrations d'inhibiteurs.

20 Protocole d'internalisation des antigènes par les cellules présentatrices de l'antigène :

$8.10^6$  cellules sont internalisées en présence de quantité saturante de protéines radiomarquées à l'iode 125 (1  $\mu$ g) dans des micropuits dans 70  $\mu$ l. Après une heure d'incubation à 4°C sous agitation, les antigènes sont fixés à la surface des  
25 cellules. La suspension cellulaire est lavée deux fois en PBS-BSA et les culots cellulaires sont repris dans 70  $\mu$ l de tampon et incubées à 37°C pendant différentes périodes allant jusqu'à 2 heures. Cellules et sumageants sont séparés par centrifugation à 800g pendant 5 minutes 4°C. Pour des plus longues périodes d'incubation, l'étape préliminaire de préfixation des antigènes à la surface des cellules est supprimée. Les  
30 cellules sont diluées dans un milieu RPMI-10% SVF en présence de 20 mM Hépès, à  $10^6$  cellules /ml. Les cellules sont incubées en présence d'un excès d'antigène pendant

différentes périodes à 37°C (1 µg de molécules /5.10<sup>7</sup> cellules monocytes/macrophages ou /10<sup>8</sup> cellules B-EBV).

Tous les agents thérapeutiques définis dans le cadre de la présente invention sont utilisés pour prévenir et/ou traiter une maladie dégénérative et/ou  
5 neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, seuls ou en combinaison. Ils peuvent être utilisés également pour évaluer leur efficacité *in vitro* ou *in vivo*.

#### Administration chez l'homme des agents thérapeutiques:

Le matériel biologique selon l'invention peut être administré *in vivo*  
10 notamment sous forme injectable. On peut également envisager une injection par voie épidermique, intraveineuse, intra-artérielle, intramusculaire, intracérébrale par seringue ou tout autre moyen équivalent. Selon un autre mode de réalisation par administration orale ou tout autre moyen parfaitement connu de l'homme de l'art et applicable à la présente invention. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée, une ou  
15 plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage les mieux appropriés varient en fonction de différents paramètres tels que par exemple l'individu ou la maladie à traiter, du stade et/ou de l'évolution de la maladie, ou encore de l'acide nucléique et/ou de la protéine et/ou peptide et/ou molécule et/ou cellule à transférer ou de l'organe/tissus cible.

20 Pour la mise en œuvre du traitement du mammifère mentionné dans la présente invention, il est possible de disposer de compositions pharmaceutiques comprenant un matériel biologique tel que précédemment décrit, avantageusement associé avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour l'administration à l'homme ou à l'animal. L'utilisation de tels supports est décrite dans la littérature (voir  
25 par exemple Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>th</sup> ed. 1980, Mack Publishing Co). Ce véhicule pharmaceutiquement acceptable est préférentiellement isotonique, hypotonique ou présente une faible hypertonicité et a une force ionique relativement basse, tel que par exemple une solution de sucrose. Par ailleurs, ladite composition peut contenir des solvants, des véhicules aqueux ou partiellement aqueux tels que de l'eau  
30 stérile, libre d'agents pyrogène et des milieux de dispersion par exemple. Le pH de ces compositions pharmaceutiques est convenablement ajusté et tamponné selon les techniques conventionnelles.

**Figures :**

La figure 1 représente la séquence en amino acides de la protéine GM2AP, et la localisation des peptides, qui est soulignée, et qui sont utilisés pour la production des anticorps anti-peptides GM2AP.

La figure 2 représente la séquence en amino acides de la protéine MRP14, et la localisation des peptides, qui est soulignée, et qui sont utilisés pour la production des anticorps anti-peptides MRP14.

La figure 3 représente la séquence en amino acides de la protéine Saposine B, et la localisation des peptides, qui est soulignée, et qui sont utilisés pour la production des anticorps anti-peptides Saposine B.

La figure 4 représente le dosage de la protéine MRP8 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 5 représente le dosage de la protéine MRP14 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 6 représente le dosage de la protéine MRP8/14 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 7 représente les concentrations moyennes des protéines MRP8, MRP14, MRP8/14 (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie.

La figure 8 représente le dosage de la protéine GM2AP (ng/ml - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie. MS

signifie SEP, OND signifie AMN et Healthy signifie prélèvements de témoins supposés sains (TS).

La figure 9 représente le dosage de la protéine Saposine B ( $\mu\text{g/ml}$  - en ordonnée) dans les urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), dans les urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN) et dans les urines de témoins considérés sains (TS). n signifie le nombre d'urines testées par catégorie. MS signifie SEP, OND signifie AMN et Healthy signifie prélèvements de témoins supposés sains (TS).

La figure 10 représente la co-détection des protéines Saposine B ( $\mu\text{g/ml}$  - en ordonnée) et GM2AP ( $\text{ng/ml}$  - en abscisse) dans des échantillons d'urine de patients SEP, de témoins supposés sains et de patients atteints d'autres maladies neurologiques et la corrélation observée entre les taux des deux protéines.

La figure 11 représente : figure 11A, le dosage de la protéine GM2AP en  $\text{ng/ml}$  dans les urines d'un patient SEP en forme rémittente progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée) ; figure 11B le dosage de la protéine Saposine B en  $\mu\text{g/ml}$  dans les urines d'un patient SEP en forme rémittente progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 12 représente le produit des concentrations des protéines GM2AP et saposine B en  $\text{ng}\times\mu\text{g/ml}^2$  dans les urines d'un patient SEP en forme rémittente progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 13 : figure 13A, le dosage de la protéine GM2AP en  $\text{ng/ml}$  dans les urines d'un patient SEP en forme progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée) ; figure 13B le dosage de la protéine Saposine B en  $\mu\text{g/ml}$  dans les urines d'un patient SEP en forme progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 14 représente le produit des concentrations des protéines GM2AP et saposine B en  $\text{ng}\times\mu\text{g/ml}^2$  dans les urines d'un patient SEP en forme progressive (courbe claire) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (courbe foncée).

La figure 15 représente la corrélation entre les concentrations de GM2AP en ng/ml (abscisse) et de gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (ordonnée) déterminées dans des urines de patients SEP et de témoins.

La figure 16 représente la corrélation entre les concentrations de Saposine B en  $\mu\text{g/ml}$  (abscisse) et de gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (ordonnée) déterminées dans des urines de patients SEP et de témoins.

La figure 17 représente la corrélation entre le produit des concentrations de GM2AP et Saposine B en  $\text{ng}\times\mu\text{g/ml}^2$  (abscisse) et de gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (ordonnée) déterminées dans des urines de patients SEP et de témoins.

La figure 18 représente la corrélation entre les concentrations en GM2AP ( $\text{ng/ml}$  - en ordonnée gauche), les concentrations en Saposine B ( $\mu\text{g/ml}$  - ordonnée droite) et la gliotoxicité en pourcentage de cellules mortes estimées par le test MTT (abscisse). Deux droites de corrélation estimées sont représentées sur le graphe. Les lignes en gras sont relatives aux concentrations en saposine B ; les lignes en noir clair sont relatives aux concentrations en GM2AP.

### Exemples :

Exemple 1 : Recueil et pool d'urines.

Des échantillons d'urine de volumes différents ont été prélevés à partir d'individus sains (SEP négatifs) n'ayant a priori aucune maladie neurologique ou auto-immune. L'activité toxique de chaque prélèvement vis à vis de cellules astrocytaires murines a été testée *in vitro* en utilisant le test MTT. Au total un pool de 20 litres d'urine a été constitué (pool SEP négatif). Parallèlement, des échantillons d'urine de volumes différents ont été prélevés à partir d'individus atteints de sclérose en plaques (SEP positifs) à différents stade de la maladie. L'activité toxique de chaque prélèvement vis à vis de cellules astrocytaires murines a été testée *in vitro* en utilisant le test MTT. Au total un pool de 80 litres d'urine a été constitué (pool SEP positif).

Exemple 2 : Purification des protéines urinaires.

Les pools d'urine SEP positif et SEP négatif, recueillis et testés selon l'exemple 1, ont été purifiés pour obtenir une concentration en protéines élevée et éliminer au maximum les protéines de haut poids moléculaire.

Précipitation : des précipitations au sulfate d'ammonium (Prolabo - réf. 21 333 365) ont été effectuées sur les pools d'urine SEP positif et SEP négatif. Le pourcentage de 60 % de sulfate d'ammonium saturé pour 40 % d'urine, soit 390 grammes de sulfate d'ammonium par litre d'urine a été utilisé. Chaque pool est réparti en fractions de 1,8 litres dans des flacons de 2 litres pour améliorer la précipitation. La précipitation a été effectuée durant 2 x 8 heures, à température ambiante, sous agitation douce. Après centrifugation des pools d'urine à 3 000 tpm pendant 10 min., à une température de 10°C, le culot obtenu est repris dans un tampon Tris 20 mM contenant du  $\text{CaCl}_2$  1 mM et de l'urée à 0,25 M. Le mélange a ensuite été centrifugé à 3 000 tpm pendant 10 min. Le surnageant contient les protéines concentrées. Il est soit utilisé immédiatement pour l'étape suivante, soit congelé si l'étape suivante ne peut être effectuée en continu.

Chromatographie par échange d'ions : la solution contenant les protéines a ensuite été passée sur un gel DEAE fast Flow (commercialisé par PHARMACIA). Cette étape est effectuée à basse pression sur une colonne PHARMACIA remplie de gel. Les tampons sont amenés sur la colonne par une pompe péristaltique qui permet un débit régulier. Le tampon d'équilibration de la colonne est le tampon Tris 20 mM, pH 7. La fraction correspondant au surnageant de précipitation et contenant une quantité de sels trop élevée est dialysée contre ce tampon avant dépôt sur la colonne. Une élution par un gradient salin permet de récupérer les protéines. Le gradient d'élution est effectué par palier de NaCl 100, 200, 300, 500 mM dans le tampon d'équilibration de la colonne. Les fractions d'élution sont testées par le test MTT et ne seront conservées que les fractions positives, soit la fraction éluee à 200 mM NaCl. Ces fractions pourront être traitées immédiatement ou conservées à l'état lyophilisé.

Purification : Une chromatographie d'exclusion stérique basée sur la différence de taille et de forme des protéines à éluer a été utilisée. La fraction correspondant à l'élution 200 mM NaCl est déposée sur la colonne. Au cours de l'élution, les protéines de faible masse moléculaire sont retenues et donc éluées plus tardivement que les grosses molécules. Les purifications ont été effectuées sur HPLC

avec une colonne TosoHaas TSK Prep G 3000 SW, d'un diamètre de 21,5 mm et d'une longueur de 300 mm, la limite d'exclusion en masse moléculaire est de 500 000 daltons. Le tampon d'élution utilisé contient du phosphate 100 mM, du sulfate de sodium 100 mM, à pH 6,8. La séparation du mélange de protéines a été effectué en 60 min. Seule la fraction correspondant à une masse de 15-20 000 daltons a été conservée. Cette fraction est dialysée dans un tampon Tris 20 mM contenant du  $\text{CaCl}_2$  0,2 mM, pH 7,2, puis lyophilisée.

A chaque étape, seules les fractions présentant une activité toxique significative ont été retenues pour l'étape suivante. Un contrôle de l'activité toxique des protéines a été effectué à chaque étape, à l'aide du test MTT. Seules les fractions présentant une activité toxique significative ont été retenues pour l'étape de purification supplémentaire décrite dans l'exemple 3.

Exemple 3 : Purification supplémentaire des protéines urinaires par chromatographie phase inverse.

Des pools d'urine provenant de patients SEP (pool SEP positif) et de patients non SEP (pool SEP négatif), obtenus après purification selon l'exemple 2, ont été repris dans de l'eau distillée, puis dilués avec une solution 0,2% TFA/10% acétonitrile pour obtenir une concentration finale d'environ 130 à 140  $\mu\text{g/ml}$ .

La séparation par HPLC phase inverse C8 a été effectuée sur une colonne Brownlee Aquapore (nom commercial) commercialisée par la société Perkin Elmer (caractéristiques de la colonne : 300 angstroms/7  $\mu\text{m}$ /(100x4,6) mm). Deux colonnes distinctes ont été utilisées respectivement pour les pools positif et négatif. Les injections ont été réalisées par multi-injections de 250  $\mu\text{l}$ . Les protéines ont été éluées avec un gradient linéaire de 5% à 15% de tampon B en 5 min., puis de 15% à 100% de tampon B en 95 min., à un débit de 0,5 ml/min. Les tampons de séparation A et B utilisés sont respectivement le tampon 0,1% TFA (Pierce n° 28904)/ eau MilliQ et le tampon 0,09% TFA/80% acétonitrile (Baker). La détection a été effectuée par mesure de l'absorbance UV à 205 et 280 nm. La collecte des fractions a été effectuée en fractions de 1,5 ml et de 0,5-1 ml dans la zone d'intérêt. Les fractions ont été congelées après la collecte dans de la carboglace.



Les fractions collectées ont ensuite été séchées en speed vac et reprises dans 100 µl de 0,1% TFA/30% acétonitrile. 20µl des fractions ont été transférés dans des eppendorfs de 500 µl, séchés et lavés à deux reprises avec 100 µl d'eau MilliQ, puis séchés de nouveau.

5 L'activité toxique des protéines contenues dans chaque fraction recueillie après élution a été déterminée à l'aide du test MTT. Seule la fraction 21 présentant une activité toxique significative a été retenue. Le numéro de cette fraction correspond à l'ordre de l'élution en fonction des conditions d'élution énoncée dans cet exemple.

10 Exemple 4: Analyse des protéines obtenues par séparation sur HPLC sur gel SDS-TRICINE.

Le pool de collecte de la fraction 21 obtenue par HPLC, comme décrit dans l'exemple 3, et provenant de 20 injections du pool SEP positif, a été déposé sur un gel SDS-TRICINE 16% précoulé de 10 puits et de 1 mm d'épaisseur (commercialisé  
15 par la société Novex). Les conditions d'utilisation du gel correspondent à celles préconisées par le fournisseur. L'échantillon est repris dans 75 µl du tampon d'échantillon 1 fois concentré (SDS-TRICINE N° LC 1676, 1 ml deux fois concentré + 50µl de β-mercaptoéthanol (Pierce) dilué au 1/2 dans de l'eau) et 25µl de l'échantillon sont déposés sur le gel en trois fois. Le pool de collecte de la fraction 21 provenant de 6  
20 injections du pool SEP négatif a été déposé sur le gel dans les mêmes conditions que celles décrites pour le pool SEP positif. La migration sur les deux gels a été effectuée en parallèle dans la même cuve de migration (XCELL II NOVEX (nom commercial)) à un voltage constant de 125 mV pendant 2 heures. La cuve est placée dans un bac contenant de la glace. Les gels ont été colorés directement après la migration par  
25 coloration au zinc/imidazole (kit de coloration 161-0440 commercialisé par la société BIORAD) pour obtenir une coloration négative réversible. Les bandes de protéines sont translucides sur fond opaque.

Exemple 5 : Digestion à la trypsine des bandes de gel.

30 Toutes les bandes de protéines visualisées dans les dépôts de la fraction 21 ont été découpées et soumises à une protéolyse par la trypsine.

Les bandes de gels sont découpées au scalpel en tranches de 1 mm et transférées dans des tubes eppendorfs. Les eppendorfs sont soumis à un pic de centrifugation pour faire tomber les morceaux de gel et après centrifugation 100 µl de tampon de lavage (100 mM  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ /50%  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) sont ajoutés aux morceaux de gel.

5 Après 30 min. d'agitation à température ambiante, le surnageant est enlevé par fractions de 20 µl et l'étape de lavage est renouvelée deux fois. Les eppendorfs sont séchés pendant 5 min. en speed vac. 20 µg de trypsine (Modified sequenal grade PROMEGA V5111) sont repris dans 200 µl de tampon de digestion (5 mM TRIS, pH 8) et sont dissous pendant 30 min. à température ambiante, sous agitation intermittente

10 et 20 à 30 µl de trypsine resuspendue sont ajoutés aux morceaux de gel. Les eppendorfs sont centrifugés et conservés en chambre chaude à 28°C pendant une nuit. Après digestion les bandes de gel peuvent être utilisées immédiatement pour les mesures de masse ou congelées pour usage ultérieur.

15 Exemple 6 : Digestion chimique au CNBR des bandes de gel.

Dans l'éventualité d'une protéine résistante aux clivages enzymatiques, en particulier à l'action de la trypsine comme décrit dans l'exemple 5, les bandes entre 16kD et 20kD ont été traitées avec du CNBR. Les bandes de gel, déjà utilisées pour les digestions avec la trypsine, sont séchées 5 à 10 min. en speed vac.

20 Une solution de CNBR (FLUKA) à 200 mg/ml a été préparée dans 70 % acide formique (BAKER). 20 µl de cette solution ont été utilisées pour réhydrater les morceaux de gel. La réaction s'est faite pendant 20 h à température ambiante et à l'obscurité. Les peptides sont extraits 3 fois 30 min. avec 100 µl de 0.1 % TFA / 60% Acétonitrile. Les solutions d'extraction sont réunies et concentrées à 20 µl. Ces

25 échantillons sont dilués 5 fois dans 0,1 % TFA/eau. Les conditions de séparation sont celles décrites pour les peptides de la digestion avec la trypsine.

Exemple 7 : Analyse par spectrométrie MALDI-TOF.

30 µl de tampon d'extraction (2 % TFA/50 % acétonitrile) sont ajoutés

30 aux échantillons. Les eppendorfs à analyser sont soumis à une centrifugation de 5 min., puis à une sonication de 5 min. et finalement à une centrifugation de 1 min.

Sur un disque en acier inoxydable, 14 dépôts de 0,5 µl de matrice (acide α-cyano-4-hydroxy-trans-cinnamique à saturation dans de l'acétone) sont réalisés. Une fine couche microcristalline uniforme est obtenue. 0,5 µl d'une solution de 2 % TFA/eau sont déposés sur cette sous-couche sur les 14 dépôts, puis 0,5 µl d'échantillon à analyser sont ajoutés. Dans cette goutte ainsi formée, 0,5 µl d'une solution à saturation d'acide d'acide α-cyano-4-hydroxy-trans-cinnamique dans 50 % acétonitrile/eau sont ajoutés. Après un séchage à température ambiante pendant 30 min., les dépôts cristallins sont lavés avec 2 µl d'eau qui sont immédiatement évacués par un soufflé d'air. Tous les spectres sont obtenus sur un spectromètre de masse BRUKER BIFLEX (marque de commerce) équipé d'un réflectron. Les mesures (90 à 120 tirs laser sur l'ensemble du dépôt) sont accumulées pour obtenir un spectre de masse qui soit le plus représentatif de l'ensemble des peptides présents dans le sandwich matrice-échantillon. Pour chaque dépôt, une calibration avec les peptides de l'autolyse de la trypsine a été faite afin de pouvoir utiliser une précision de mesure inférieure à 100 ppm.

Les recherches dans les banques de données ont été exécutées dans MS-FIT PROTEINPROSPECTOR (<http://prospector.ucsf.edu>). Les paramètres communs, utilisés dans ces recherches, sont (1) base de données : NCBIInr, (2) une tolérance de 100-50 ppm, (3) les cystéines ne sont pas modifiées, (4) les méthionines peuvent être oxydées, (5) gamme de poids moléculaire : 1000-100000 Da, (6) jusqu'à 3 sites de coupure peuvent être ignorés.

#### Exemple 8 : Séquençage N-terminal des peptides de digestion.

##### (i) Extraction et séparation par HPLC des peptides de digestion.

Après les mesures de masse sur la totalité de la digestion, le reste des peptides est extrait en 3 fois 30 min. dans un bain de sonication avec 0,1 % TFA/60 % acétonitrile. Les solutions d'extraction sont réunies et séchées jusqu'à 20 µl en speed vac. Après dilution dans 80 µl de tampon A (0,1 % TFA/eau), les extractions des bandes de gel, digérées avec de la trypsine, sont injectées sur une colonne C18/MZ-Vydac/(125x1.6)mm/5 µm. L'élution des peptides se fait à un débit de 150 µl/min. et dans un gradient allant de 5 % de tampon B (0,09 % TFA/80 % acétonitrile) à 40 % de tampon B en 40 min., puis de 40 % de tampon B à 100 % de tampon B en 10 min. La

détection est faite par mesure de l'absorbance UV à 205 nm. La collecte des pics est effectuée dans des tubes eppendorf de 500 µl. Les fractions sont conservées sur la glace et pour la bande de 18-20 kD du pool 21 SEP positif analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

5 (ii) Séquençage N-terminal.

Les fractions ne correspondant qu'à un seul pic de masse ont été analysées par dégradation d'Edman sur un séquenceur (Modèle 477A PERKIN ELMER/Applied Biosystems). Les conditions de séquençage sont celles décrites par le constructeur. Une micro cartouche a été utilisée pour le dépôt des échantillons et les PTH-AminoAcid  
10 sont identifiés avec un système HPLC online (Modèle 120A PERKIN ELMER/Applied Biosystems).

Le dépôt de la fraction à séquencer s'est fait en plusieurs dépôts de 15 µl avec des séchages intermédiaires. Le tube ayant contenu le peptide est lavé avec 15 µl d'acide formique 85 % (BAKER). Les séquences d'acides aminés correspondent  
15 toujours aux masses mesurées. Les peptides, dont les masses ne correspondent pas à la protéine principale identifiée, ont été séquencés en priorité. De cette manière, il a été possible d'identifier jusqu'à trois protéines dans une bande de gel.

Exemple 9 : Résultats et discussion.

20 Après HPLC inverse du pool témoin SEP négatif et du pool SEP positif, l'activité toxique de chaque fraction d'élution a été déterminée en utilisant le test MTT. Seule la fraction 21 du pool SEP positif présente une activité toxique *in vitro*. La fraction 21 du pool témoin SEP négatif ne présente aucune activité toxique. L'activité toxique de la fraction 21 du pool SEP positif a été confirmée *in vitro* par FACS, comme  
25 décrit dans la demande de brevet WO 98/11439 sur des cellules astrocytaires murines.

Le contenu protéique de la fraction 21 du pool témoin SEP négatif et du pool SEP positif a été observé après séparation sur gel SDS-TRICINE 16% et coloration du gel au zinc/imidazole. Des protéines de poids moléculaires apparents élevés ont été trouvées dans les deux fractions. Par contre cinq bandes différentes et de  
30 poids moléculaires apparents faibles ne sont visibles que dans la fraction 21 du pool SEP positif (bandes 8, 14, 18 et 20 kD). A chaque bande correspond au moins une protéine et des variants desdites protéines qui ont un poids moléculaire apparent proche

de celui de la protéine native. Ces séquences variantes présentent un pourcentage d'homologie ou d'identité avec les séquences natives d'au moins 70%, de préférence d'au moins 80% et avantageusement d'au moins 98 %.

Les protéines d'intérêt de la fraction 21 du pool SEP positif ont ensuite été  
5 analysées par spectrométrie de masse et/ou séquençage et recherche d'homologie dans les banques de données. Les résultats montrent la présence de cinq bandes de protéines migrant entre 22 et 5 kD dans la fraction 21 du pool SEP positif et des variants desdites protéines.

Ces protéines sont le fragment C-terminal du Perlecan, qui commence à  
10 l'acide aminé 3464 et se termine à l'acide aminé 3707 de la séquence protéique complète, identifiée dans l'identificateur de séquences SEQ ID N° 2, le précurseur de la protéine plasmaticque de liaison au rétinol dont la séquence est donnée en SEQ ID N° 4, le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2 identifié en SEQ ID N° 8, la calgranuline B identifiée en SEQ ID N° 17 et la saposine B représentée en SEQ ID N°  
15 24. Comme décrit ci dessus des homologues ou variants desdites protéines ont également été identifiés par séquençage. Ces séquences protéiques homologues ou variantes sont le produit de mutations au niveau des gènes codant pour lesdites protéines. A titre d'exemple, la SEQ ID N° 9 présente 99 % d'homologie ou d'identité avec la SEQ ID N° 8 du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2 et le fragment  
20 de SEQ ID N° 9 qui commence à l'acide aminé 34 et se termine à l'acide aminé 202 présente 98,88 % d'homologie ou d'identité avec le fragment correspondant de la protéine native identifiée en SEQ ID N° 8.

Exemple 10 : Mise en évidence des protéines dans un échantillon urinaire.

25 Des échantillons d'urine provenant d'un individu SEP négatif et d'un patient SEP positif ont été prélevés. Ces échantillons d'urine ont été purifiés selon le protocole décrit précédemment. Les fractions d'élution finales 21 ont été analysées séparément par spectrométrie de masse. Le profil de masse de chaque fraction correspondant à chaque échantillon d'urine a été comparé au profil de masse obtenu  
30 pour les protéines identifiées dans les exemples précédents. Les résultats montrent que pour l'échantillon d'urine provenant du patient SEP positif les masses correspondent aux molécules (i) fragment C-terminal du Perlecan, (ii) précurseur de la protéine

activatrice du ganglioside GM2, (iii) calgranuline B et (iv) saposine B identifiées précédemment. Par contre aucune de ces masses n'a été identifiée dans le profil de masse obtenu après analyse de l'échantillon d'urine provenant de l'individu SEP négatif. Le procédé décrit est utilisable comme essai de diagnostic.

5

#### Exemple 11 : Essai en Western Blot.

Des Western Blot ont été réalisés sur différentes fractions d'urine brute ou purifiée comme décrit dans l'exemple 2. Des échantillons d'urine provenant d'individus sains et de patients atteints de sclérose en plaques sont testés en parallèle.

10 Les échantillons sont déposés sur un gel d'électrophorèse permettant de séparer les différentes protéines en fonction de leur masse moléculaire sous l'action d'un champ électrique. Les Western Blot sont réalisés après transfert des protéines du gel sur une membrane. Pour révéler les protéines transférées, la membrane est saturée en tampon de saturation, puis incubée avec un anticorps directement marqué à la phosphatase

15 alcaline. L'anticorps utilisé est un anticorps anti-calgranuline (anticorps monoclonal de souris, clone CF 145 sous-type IgG 2b commercialisé par la société Valbiotech : référence MAS 696p lot PC96G696). Le substrat de l'enzyme est le dichlorure de 3,3'-(1,1'-biphényl)4,4'diazonium et 2-naphtalényle phosphate de sodium (commercialisé sous la dénomination  $\beta$  Naphtyl acid phosphate Sigma réf. N7375 et  $\delta$  dianisine

20 Tetrazotized D3502) est ajouté pour la révélation des bandes et la visualisation des protéines liées à l'anticorps. Une molécule de masse moléculaire apparente d'environ 14 000 est révélée dans les urines purifiées de patients atteints de SEP, avec un signal relativement intense. Cette protéine correspond à la calgranuline B (masse moléculaire apparente : 14 kD). Par contre, aucun signal n'est observé à partir d'urine d'individus

25 sains. Cette observation confirme la présence de cette protéine spécifiquement dans les urines de patients atteints de SEP et la mise en œuvre d'un procédé de détection utilisant un anticorps reconnaissant la protéine.

#### Exemple 12 : Production d'anticorps monoclonaux.

30 La production d'anticorps monoclonaux par ascite impose une compatibilité du système H-2 entre l'hybridome et la souris productrice. 20 souris femelles Balb/c, âgées de 6 semaines, subissent une injection de 0.5ml de Pristane (2-6-

10-14 acide tétraméthylpentadécane) dans leur cavité péritonéale, pour la production d'ascite (Porter et al., 1972). Une semaine à 10 jours plus tard,  $5.10^6$  à  $10.10^6$  hybridomes dilués dans 0.5ml de tampon stérile NaCl 0,145M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 mM à pH 7.4. sont injectés par voie intrapéritonéale. L'ascite apparaît une à deux semaines plus tard. Les liquides d'ascites présents dans la cavité péritonéale sont alors recueillis avec une seringue après incision du péritoine. Le liquide recueilli est centrifugé à 3000g pendant 15 minutes à température ambiante, filtré sur gaze pour éliminer le gras, puis tamponné en ajoutant 1/20<sup>ème</sup> de son volume de tris-HCl 1M à pH 8.0. Cette méthode permet d'obtenir des quantités d'anticorps 10 fois supérieures à celles obtenues par culture d'hybridomes.

Les immunoglobulines présentes dans le liquide d'ascite sont relarguées par les sels (sulfate d'ammonium ou sulfate de sodium). Le liquide d'ascite est précipité par le sulfate d'ammonium 40%. Après 20 minutes au froid la solution est centrifugée 15 minutes 8000g à 4°C. Le précipité est lavé et resuspendu à froid dans une solution de sulfate d'ammonium 40% puis de nouveau centrifugé. Le nouveau précipité enrichi en IgG est remis en solution dans du tampon PBS et dialysé la nuit contre le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM pH 7,4. Parallèlement une colonne d'agarose-Protéine A (ou protéine G) (commercialisée sous forme lyophilisée, Pierce) est lavée extensivement avec le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150mM pH7.4. La solution enrichie en IgG est déposée sur la colonne puis la colonne est lavée. Les IgG retenues par la colonne sont éluées à pH acide (glycine 200 mM pH 2.8). Les fractions éluées sont neutralisées avec un volume de Tris-Base 1M pH 10.5. Le contenu en immunoglobulines de chaque fraction recueillie est quantifiée par lecture d'absorbance à 280 nm ( $\epsilon$  1%.1cm = 14.0 Prahl et Porter 1968). Les fractions riches sont poolées. Le degré de purification des IgGs poolées est analysé par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS. Les IgGs purifiées sont dialysées une nuit contre le tampon Tris-HCl 25 mM, NaCl 150mM pH7.4, filtrées stérilement, aliquotées et conservées à -20°C. leur concentration finale est déterminée par lecture de l'absorbance à 280 nm ou par dosage micro-BCA. Les peptides immunogènes référencés SEQ ID N° 58, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 58, SEQ ID N° 59 et SEQ ID N° 65 ont été utilisés pour la production d'anticorps monoclonaux, selon le protocole décrit ci dessus. Mais, il est à la portée de l'homme du

métier de définir d'autres protocoles pour la production d'anticorps monoclonaux, par exemple à partir des techniques décrites par Köhler et Milstein et par Galfre G. *et al.* précédemment cités ou des techniques dérivées de celles ci.

5 Production de protéines recombinantes et d'anticorps polyclonaux et monoclonaux.

Protéines recombinantes :

Les protéines recombinantes GM2AP (SEQ ID NO :73) et Saposine B (SEQ ID NO :74) utilisées pour réaliser la gamme étalon de cette étude ont été produites en système procaryote et purifiées à partir des clones de ces deux protéines  
10 obtenus dans notre laboratoire en utilisant les méthodes et protocoles bien connus de l'homme de l'art.

Anticorps anti-GM2AP ou anti-Saposine B :

Les anticorps anti-GM2AP ou anti-Saposine B utilisés pour réaliser l'étude ont été soit produits dans notre laboratoire ou donnés généreusement.  
15 Des anticorps polyclonaux anti-Saposine B et anti-GM2AP (Li et al, Glycoconjugate, 1984) ont été utilisés pour l'étude (cf les exemples ci-dessous) : ils sont dénommés SAP84 et GM2AP84.

Des anticorps polyclonaux anti-GM2AP ou anti-Saposine B ont été produits et purifiés dans le laboratoire en utilisant les protocoles et méthodes bien connus de l'homme de l'art : 50 µg de protéine GM2AP ou Saposine B procaryote achetée ont été injectés à des lapins aux jours J0, J28 et J56 ; deux injections de rappel ont été réalisés une fois par mois pendant deux mois consécutifs. Les deux anticorps polyclonaux anti-GM2AP et deux anticorps polyclonaux anti-Saposine B ont ainsi été obtenus et leur spécificité vis-à-vis de la protéine recombinante a été vérifiée par  
20 Western blot et par Elisa.

Des anticorps polyclonaux anti-peptides GM2AP ou Saposine B ont été produits et purifiés dans le laboratoire en utilisant les protocoles et méthodes bien connus de l'homme de l'art : 75 µg de peptides GM2AP ou Saposine B définis, produits et couplés à KLH dans notre laboratoire ont été injectés aux jours J0, J28 et  
30 J56 ; plusieurs boosts ont été réalisés une fois par mois pendant 5 mois consécutifs avec injection de 75 µg à chaque fois. Quatre anticorps polyclonaux anti-peptides GM2AP, quatre anticorps polyclonaux anti-peptides Saposine B et quatre anticorps



polyclonaux de lapins anti-peptides MRP14 ont ainsi été obtenus et leur spécificité vis-à-vis de la protéine recombinante a été vérifiée par Western blot et par Elisa. La séquence des peptides GM2AP, Saposine B et MRP14 choisis sont décrites dans les figures de 1 à 3.

5 Il a été obtenu :

- un anticorps anti-mélange de deux peptides de 13 et 15 acides aminés de GM2AP : 189-190 ; un anticorps anti-peptide de 18 acides aminés de GM2AP : 191-192 (cf. Figure 1),

10 - un anticorps anti-mélange de deux peptides de 13 et 19 acides aminés de MRP14 : 193 ; un anticorps anti-peptide de 17 acides aminés de MRP14 : 195-196 (cf. Figure 2),

- un anticorps anti-mélange de trois peptides de 12, 15 et 15 acides aminés de Saposine B : 74-75 ; un autre anticorps anti-mélange de 3 peptides de 12, 15 et 15 acides aminés de Saposine B : 72-73 (cf. Figure 3).

15 Des anticorps monoclonaux anti-fraction native ont été produits et purifiés dans le laboratoire en utilisant les protocoles et méthodes bien connus de l'homme de l'art. La « fraction native » correspond à la fraction d'élution cytotoxique obtenue à partir du pool des 80 litres d'urine de patients SEP et après purification. C'est la dernière fraction d'élution qui contient les trois protéines GM2AP, Saposine B, MRP14. 30 µg de cette fraction de purification ont été injectés à trois souris aux jours J0, J14, J28 et le prélèvement a été effectué à J38. Après « screening » et fusion cellulaire, protocoles connus de l'homme de l'art pour l'établissement d'hybridomes et d'anticorps monoclonaux, les hybridomes ont été ré-injectés à la souris et le liquide d'ascite a été récupéré 10 jours après. Les anticorps ont été purifiés sur colonne  
25 sépharose-Protéine A et la spécificité vis-à-vis de la fraction utilisée pour l'immunisation a été vérifiée par Western blot et par Elisa. Ainsi quatre anticorps monoclonaux ont été obtenus : 19C1A7, 3D3F9, 18C8C5 et 7D12A8.

Exemple 13 : Dosage des protéines MRP14 dans les urines par technique  
30 ELISA.

Les protéines MRP14, MRP8 et l'hétérocomplexe MRP8/14 ont été dosés dans des urines humaines en utilisant (i) soit une technique de dosage Elisa selon le

procédé connu de l'homme de l'art et en utilisant les anticorps anti-MRP décrits dans les exemples précédents ; (ii) soit le kit 'MRP Enzyme Immunoassay' commercialisé par BMA Biomedicals AG, Augst, Switzerland, en utilisant les anticorps du kit, le protocole étant réalisé suivant la notice du kit..

5                   Détection de MRP14 et MRP8/14 dans des urines.

Les dosages a été réalisés à partir de 17 urines d'individus issus de la population active (TS), de 27 urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP et de 7 urines de patients atteints d'autres maladies neurologiques (AMN).

10               - La figure 4 illustre les taux de MRP8 dosés dans ces urines : alors que la concentration en MRP8 est quasiment nulle dans les urines AMN, il n'y a pas vraiment de différence de distribution entre les urines TS et SEP. Notons cependant que les différences observées sont quasiment négligeables car les concentrations dosées sont extrêmement faibles.

15               - La figure 5 illustre les taux de MRP14 dosés dans les mêmes urines : alors qu'il n'y a pas vraiment de différences de distribution des concentrations entre les urines TS et AMN, les concentrations sont plus élevées dans certaines urines SEP.

20               - La figure 6 illustre les taux d'hétérodimère MRP8/14 dosés dans les mêmes urines : alors qu'il n'y a pas vraiment de différence entre les concentrations des urines TS et AMN, on observe des plus fortes concentrations dans certaines urines SEP, correspondant peut-être à une sous population de patients SEP caractérisée par une activité de la maladie. MRP8/14 dosé dans les urines est un marqueur de l'activité de la maladie SEP caractérisée par un pic d'inflammation).

25               - La figure 7 récapitulative confirme qu'il n'y a pas de différence significative de concentration en MRP8 et en MRP14 entre les urines TS, AMN et SEP, alors qu'une faible différence de concentration en MRP8/14 est observée entre ces urines, cette concentration étant plus élevée en moyenne dans les urines SEP et étant un marqueur de l'activité de la maladie (pic d'inflammation).

30               Exemple 14 : Protocoles ELISA utilisés pour le dosage des protéines GM2AP et Saposine B.

Les protéines GM2AP ou Saposine B ont été dosées dans des urines humaines en utilisant des anticorps polyclonaux anti-GM2AP ou anti-Saposine B ? en

suivant le protocole Elisa décrit par Gardas et al. (Glycoconjugate Journal 1, 37-42, 1984). Les principales étapes sont brièvement décrites ci-dessous :

A chaque étape, les puits d'une microplaque de 96 puits sont remplis avec 200 µl de la solution désignée. Les puits sont d'abord « coatés » avec une solution de  
5 GM2AP (protéine recombinante procaryote) diluée à 50 ng/ml dans un tampon carbonate-bicarbonate, pH 9,6. Après incubation une nuit à 4°C, la solution est éliminée et les puits sont lavés quatre fois avec du tampon PBS pH 7,4 contenant du Tween-20 0.05% (PBS-Tween). Les microplaques ainsi coatées sont stockées à 4°C pendant environ 2 semaines.

10 Les échantillons d'urine à trois dilutions différentes (20x, 40x et 80x ou d'autres dilutions appropriées) sont incubés avec une dilution appropriée de l'anticorps polyclonal de lapin anti-GM2AP ou anti-Saposine B pendant une nuit à 4°C. Une série de dilutions standard d'une protéine recombinante allant de 2,0 à 62,5 ng/ml est utilisée pour réaliser la gamme étalon et sont traitée de la même façon. Toutes les dilutions sont  
15 faites en tampon PBS-Tween contenant 1 mg/ml d'ovalbumine. Ainsi, 0,2 ml de chaque solution incubée est ajoutée dans des puits « coatés » en duplicat et les plaques sont laissées pendant 2 heures à température ambiante. Les puits sont alors lavés quatre fois en PBS-Tween et remplis encore avec une solution d'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplés à la peroxidase et diluée environ 1200 fois. Après une incubation de 2  
20 heures à température ambiante, les puits sont lavés quatre fois en PBS-Tween et remplis e nouveau avec le réactif de coloration. Le réactif de coloration consiste en 100 mg d'acide 2,2'-azino-di-(3-éthylbenzothiazoline) sulfonique et 10µl de 30% de peroxide d'hydrogène pendant une heure à température ambiante et le degré de coloration de chaque micropuits est estimé par lecture d'absorbance à 405 nm.

25 Une courbe standard est construite en mettant en abscisse la concentration de GM2AP de la gamme étalon ou de Saposine B avec une échelle logarithmique et en ordonné le pourcentage d'absorbance avec une échelle linéaire. Le pourcentage d'absorbance de l'échantillon est le rapport d'absorbance entre l'échantillon d'urine et le contrôle qui contient seulement l'antisérum, sans l'antigène soluble.

30 Une solution de protéine recombinante GM2AP produite en système procaryote, et de concentration 3 mg/ml est diluée en tampon carbonate 50 mM, pH 9,6 et 50µl sont ajoutés dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits, soit 50µl par puits

d'une solution à 0,5 µg/ml. Les plaques ainsi préparées sont incubées une nuit à température ambiante. L'anticorps polyclonal anti-GM2AP produit dans le laboratoire (lapin 79) a été purifié et dilué en tampon PBS-Tween 0,05% en présence de sérum de cheval 10%. Cette solution est diluée au 1/8000<sup>ème</sup>. La solution est utilisée pour réaliser

5 une gamme étalon avec 8 points de gamme couvrant les concentrations de 0 à 500 ng/ml. Une préincubation est réalisée pendant une nuit à température ambiante entre 100 µl d'anticorps et 100 µl d'échantillon d'urine à doser ou de solution protéine recombinante GM2AP ou Saposine B servant pour la gamme étalon. Après lavage de la microplaque en PBS-Tween, 50µl du mélange d'incubation sont ajoutés par puits, puis

10 incubés pendant deux heures à température ambiante. La microplaque est de nouveau lavée en PBS-Tween, puis 50 µl d'anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxidase et dilués au 1/5000 sont ajoutés dans chaque micropuits de la plaque et incubés pendant deux heures à température ambiante. Après de nouveaux lavages de la microplaque, 100µl d'OPD sont ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 20 minutes à

15 température ambiante. La coloration de chaque puits, proportionnelle à la concentration de GM2AP ou de Saposine B reconnue par l'anticorps spécifique utilisé, est estimée par lecture d'absorbance.

Une solution de protéine recombinante GM2AP ou Saposine B produite

20 en système procaryote, et de concentration 3 mg/ml est diluée en tampon carbonate 50 mM, pH 9,6 et 50µl sont ajoutés dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits, soit 50µl par puits d'une solution à 1,5 µg /ml. Les plaques ainsi préparées sont incubées une nuit à température ambiante. Les anticorps polyclonaux anti-peptides GM2AP produits dans le laboratoire (lapin 190 et lapin 191) purifiés sont utilisés seuls ou en

25 mélange dilués au 1/1000 pour chacun en tampon PBS-Tween 0,05% en présence de sérum de cheval 10%. La gamme étalon est réalisée en utilisant de la protéine recombinante procaryote GM2AP ou Saposine B diluée de façon à couvrir la gamme de concentration 0 à 1500 ng/ml avec 8 points. 100 µl d'anticorps (un anticorps ou les deux ensemble) sont pré-incubés en présence de 100µl d'échantillon d'urine à tester ou

30 de solution GM2AP ou Saposine B recombinante, pendant une nuit à température ambiante. Après lavage de la microplaque en PBS-Tween, 50µl du mélange d'incubation est ajouté par puits puis incubés pendant deux heures à température

ambiante. La microplaque est de nouveau lavée en PBS-Tween, puis 50 µl d'anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxidase, dilués au 1/5000, sont ajoutés dans chaque micropuits de la plaque et incubés pendant deux heures à température ambiante. Après lavage de la microplaque, 100µl d'OPD sont ajoutés dans chaque puits et incubés  
5 pendant 20 minutes à température ambiante. La coloration de chaque puits, proportionnelle à la concentration de GM2AP ou Saposine B reconnue par l'anticorps spécifique utilisé, est estimée par lecture d'absorbance.

Exemple 15 : Dosage des protéines GM2AP dans les urines.

10 La protéine GM2AP a été dosée dans les urines de 22 patients atteints de sclérose en plaques (SEP), 5 patients atteints d'autres maladies neurologiques (OND) et 9 individus choisis parmi la population active et recueillies pendant une visite médicale (Healthy), en suivant le protocole Elisa décrit ci-dessous, utilisant des anticorps polyclonaux anti-GM2AP. Les patients SEP sélectionnés pour cette étude sont des  
15 patients tout azimut, c'est-à-dire avec différents stades et profils de la maladie, et différents traitements, etc...

Les résultats du dosage sont rapportés dans la figure 8. Alors que seulement 0/5 urines OND et 2/9 urines dites 'Healthy' présentent une concentration en GM2AP supérieure à 200 ng/ml, 10/22 (soit 45%) présentent une concentration  
20 supérieure à 200 ng/ml.

Ces résultats indiquent que si la protéine GM2AP est présente en très faible concentration (<400 ng/ml) dans les urines d'individus de la population active, elle est présente en plus forte concentration dans les urines de patients SEP. Cependant 12 urines SEP présentent également des taux faibles de GM2AP. Parmi ces 12 patients,  
25 10 sont en traitement. Les fortes concentrations urinaires de GM2AP semblent être un marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément un marqueur d'un stade ou d'une forme de la maladie, de l'activité de la maladie, et est certainement influencé par tout traitement en cours. Notons que deux individus de la population active ont des concentrations élevées de GM2AP (ces deux cas ont été inclus volontairement dans  
30 l'étude, car ils présentaient tous deux une activité gliotoxique dans leur urines contrairement aux autres individus de cette même catégories). Il est impossible de savoir s'il s'agit d'individus sains, ou atteints d'une pathologie, ou des individus

atteints d'une sclérose en plaques car les échantillons des individus dits « Healthy » ont été prélevés de manière anonyme, sans connaissance du dossier clinique.

Des concentrations urinaires plus élevées de GM2AP sont détectées dans les urines de patients SEP ; une concentration élevée de GM2AP peut être alors un marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément d'une forme de la maladie, d'un stade de la maladie, d'une période d'activité, et peut être influencée par tout traitement en cours. Ces concentrations urinaires élevées en GM2AP peut également avoir une valeur prédictive d'un début d'aggravation de la maladie, ou d'une SEP bénigne en début d'évolution, etc ....

Les valeurs absolues des concentrations GM2AP détectées dans les urines sont dépendantes de l'affinité et de la spécificité de l'anticorps utilisé, mais d'une façon générale, la tendance entre les trois groupes d'individus est conservée quelque soit l'anticorps utilisé.

Exemple 16 : Dosage des protéines Saposine B dans les urines.

La protéine Saposine B a été détectée dans les même échantillons d'urines que ceux utilisés pour l'étude de la détection de GM2AP. Les dosages ont été réalisés en parallèle avec ceux du GM2AP, dans une même étude, en suivant le protocole Elisa décrit ci-dessous, utilisant des anticorps polyclonaux anti-Saposine B.

Les résultats du dosage Saposine B sont reportés dans la Figure 9. 0/5 urines OND et 2/9 urines Healthy présentent une concentration en Saposine B supérieure à 2 µg/ml, alors que 6/22 (soit 27%) présentent une concentration supérieure à 2 µg /ml.

Ces résultats indiquent que la protéine Saposine B est présente dans chaque urine (population dite saine ou population dite malade) à des concentrations non négligeables, c'est-à-dire < 2µg /ml. Ces résultats de dosage sont compatibles avec ceux décrits dans la bibliographie. Cependant même si la Saposine B est présente dans chaque urine, elle semble être présente en plus forte concentration dans certaines urines SEP. Cette augmentation de concentration de saposine B dans les urines Sep est peut-être masquée par la concentration basale de cette protéine à l'état ordinaire. Ainsi les fortes concentrations urinaires de Saposine B semblent être un marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément un marqueur d'un stade ou d'une forme de la

maladie, de l'activité de la maladie, et est certainement influencée par tout traitement en cours. La Saposine B dosée seule semble être cependant un marqueur un peu moins discriminant d'une forme ou d'une activité de la maladie que le GM2AP. Notons encore un fois que deux individus de la population active ont des concentrations élevées de Saposine B et que ce sont les deux même individus qui présentaient aussi une forte concentration en GM2AP dans leurs urines.

En conclusion, des concentrations urinaires plus élevées de Saposine B sont détectées dans les urines de patients SEP ; une concentration élevée de Saposine B peut être alors un marqueur de la pathologie SEP, et plus précisément d'une forme de la maladie, d'un stade de la maladie, d'une période d'activité, et peut être influencée par tout traitement en cours. Ces concentrations urinaires élevées en GM2AP peut également avoir une valeur prédictive d'un début d'aggravation de la maladie, ou d'une SEP benigne en début d'évolution, etc .... Mais d'une façon générale, les fortes concentrations de Saposine B seules semblent être des marqueurs moins discriminants que les fortes concentrations de GM2AP seules.

Les valeurs absolues des concentrations Saposine B détectées dans les urines sont dépendantes de l'affinité et de la spécificité de l'anticorps utilisé, mais d'une façon générale, la tendance entre les trois groupes d'individus est conservée quelque soit l'anticorps utilisé.

Exemple 17 : Co-dosage des protéines GM2AP et Saposine B dans les urines.

La Figure 10 reporte les concentrations de GM2AP dosée dans les échantillons d'urine décrites dans la Figure 5 par rapport à la concentration de Saposine B dosée dans ces mêmes échantillons et décrite dans la Figure 6. Dans ce graphe sont reportés les échantillons SEP (losanges foncés) et les échantillons OND et 'Healthy' (losanges blancs).

Sur ce graphe, il apparaît clairement que :

- plus la concentration en GM2AP est élevée dans les urines, plus la concentration en Saposine B est élevée. (Nous avons montré que ce n'est pas un cas général avec d'autres protéines et que cela ne traduit pas une perturbation rénale, avec le dosage de la créatinine en parallèle pour chacun des échantillons testés.) ;

- les concentrations élevées de GM2AP et Saposine B sont caractéristiques des échantillons SEP (à l'exception des deux urines de la population active, mentionnées ci-dessus). Ces concentrations élevées conjointes de GM2AP et Saposine B sont des marqueurs de la pathologie SEP, plus précisément d'une fenêtre de la maladie (quadrant à droite et en haut du graphe).

En conclusion, cette analyse confirme que des concentrations urinaires élevées de GM2AP ( $>400$  ng /ml) et de Saposine B ( $>2$  µg /ml) sont co-détectées dans les urines de patients SEP et peuvent représenter des marqueurs de la pathologie SEP, plus précisément d'une forme de la maladie, d'un stade de la maladie, d'une période d'activité, et peuvent être influencée par tout traitement en cours. Il est avantageux de doser les deux protéines en parallèle dans chaque échantillons, et de considérer les deux concentrations.

Dosage de GM2AP et Saposine B dans l'urine de deux patients en cinétique.

Patient SEP n°1 - Forme Rémittente Progressive.

Des urines de ce patients ont été prélevées au cours de l'évolution de sa maladie. Le patient a été hospitalisé à J0 pour une poussée. Il a subi à J1 un flash de corticoïdes puis a été suivi dans le temps d'un point de vue clinique (le flash a apporté une amélioration clinique). La figure 11 montre le profil de dosage du GM2AP et de la Saposine B dans ces urines au cours de l'évolution, et la figure 12 montre le profil du produit des deux concentrations en GM2AP et Saposine B, traduisant une co-détection de concentrations élevées. Les concentrations en GM2AP et Saposine B élevées au moment de la poussée et de l'hospitalisation, diminuent progressivement dans le temps après le flash de corticoïdes jusqu'à 90 jours.

Patient SEP n°2 - Forme Progressive.

Des urines de ce patients ont été prélevées au cours de l'évolution de sa maladie. Le patient a été hospitalisé à J0 pour une poussée. Il a subi à J1 un flash d'Endoxan puis a été suivi dans le temps d'un point de vue clinique (le flash a apporté une amélioration clinique et à J60, des signes d'aggravation de la maladie ont été observés). La figure 13 montre le profil de dosage du GM2AP et de la Saposine B dans ces urines au cours de l'évolution, et la figure 14 montre le profil du produit des deux concentrations en GM2AP et Saposine B, traduisant une co-détection de concentrations



élevées. Les concentrations en GM2AP et Saposine B élevées au moment de la poussée et de l'hospitalisation, diminuent progressivement dans le temps après le flash d'Endoxan (ou encore appelé cyclophosphamide) jusqu'à 23 jours et semblent augmenter pour devenir élevées à J60, montrant ainsi une parfaite corrélation avec l'évolution des signes cliniques.

Ces résultats confirment que :

- des concentrations fortes de GM2AP et Saposine B dans les urines sont des marqueurs de la pathologies SEP, et en particulier la co-détection des fortes concentrations des deux protéines conjointement (traduit par le produit des deux concentrations) ;

- les fortes concentrations de GM2AP et Saposine B dans les urines sont des marqueurs de l'activité de la maladie (ici pendant la poussée) ou sont des marqueurs influencés par les traitements immuno-suppresseurs comme les corticoïdes ou l'Endoxan qui abaissent les concentrations.

Cet exemple illustre le fait que ces marqueurs peuvent être utilisés entre autres :

- pour réaliser un suivi thérapeutique d'un patient et évaluer le bénéfice thérapeutique d'un traitement pour un patient donné ; ou

- de prédire une aggravation de la maladie, prédire un pic d'activité, etc...

- de décider une (re)prise thérapeutique anticipée sur les signes cliniques

Exemple 18 : Corrélation ente la détection des protéines MRP14, GM2AP et Saposine B dans les urines et la gliotoxicité mesurée dans ces urines.

Afin de vérifier une corrélation entre la présence de ces protéines seules ou en combinaison dans les urines et la gliotoxicité des urines, ont été dosées en parallèle les concentrations en protéine d'intérêt et la gliotoxicité d'un échantillonnage d'urines de patients atteints de sclérose en plaques (SEP), de patients atteints d'autres maladies neurologiques (OND) et d'individus issus de la population active dit « Healthy ». Parmi les patients SEP, on note des patients avec différentes formes et stades de la maladie, sous traitement ou non, à différentes activités de la maladie.

Les protéines MRP, GM2AP et Saposine B ont été dosées dans des urines humaines en suivant les protocoles Elisa décrits ci-dessus. Les dosages analysés dans

cet exemples sont ceux décrits dans les exemples précédents. Chaque échantillon d'urine analysé en Elisa a été analysé par le test MTT pour mesurer la gliotoxité de chaque échantillon. La gliotoxité est exprimée en pourcentage de cellules mortes (estimé par colorimétrie en utilisant les sels de tetrazolium) d'une lignée cellulaire astrocytaire murine (CLTT1.1) après 48 heures d'incubation en présence d'urine centrifugée.

La figure 15 représente la concentration en GM2AP en fonction de la gliotoxité des urines déterminée par test MTT.

22 urines SEP (losanges gris), 5 urines AMN (losanges noirs) et 9 urines dites « Healthy » (losanges noirs) ont été reportés sur le graphe. Ce sont les mêmes urines qui ont été étudiées dans les exemples 15 et 16. On observe que toutes les urines témoins (OND et Healthy) ont des taux en GM2AP faibles (<400 ng/ml) et une gliotoxité faibles (<15%), à l'exception d'une urine témoin Healthy (déjà commentée dans l'exemple 15) pour laquelle on observe une forte concentration en GM2AP et une gliotoxité.

Les urines SEP sont réparties en trois sous-populations :

- urines à faible concentration en GM2AP (<400 ng /ml) et faible gliotoxité (<15%),
- urines à faible concentration en GM2AP (<400 ng /ml) et gliotoxité (>15%), soit essentiellement 3 urines,
- urines à forte concentration en GM2AP (>400 ng /ml) et forte gliotoxité (>15%).

Ces trois sous populations traduisent peut-être des sous populations SEP, c'est-à-dire différentes formes ou stades de la maladie, différentes activités de la maladie, différents bénéfices thérapeutiques, ....

Cependant on peut noter que toutes les urines présentant une forte concentration en GM2AP présentent également une forte gliotoxité.

En conclusion : on observe une corrélation entre concentration urinaire élevée en GM2AP et gliotoxité (toutes les urines avec une forte concentration en GM2AP sont gliotoxiques (10/10), et toutes les urines avec une faible concentration en GM2AP ne sont pas gliotoxiques (<15%), à l'exception de 3 urines/12 SEP). Ceci traduit l'implication de la protéine GM2AP dans le mécanisme de gliotoxité, seule ou

en combinaison, sous sa forme naturelle ou modifiée, mais reconnaissable par un anticorps anti-GM2AP. De plus la co-détection d'une forte concentration en GM2AP dans les urines et d'une forte gliotoxité corrèle avec une sous population de patients atteints de SEP.

5 La figure 16 représente la concentration en Saposine B en fonction de la gliotoxité des urines déterminée par test MTT.

22 urines SEP (losanges gris), 5 urines AMN (losanges noirs) et 9 urines dites «Healthy » (losanges gris clair) ont été reportés sur le graphe. Ce sont les mêmes urines qui ont été étudiées dans les exemples 15 et 16. On observe que plus les urines  
10 sont riches en Saposine B, plus elles sont gliotoxiques. Il y a une corrélation assez nette entre concentration de Saposine B et gliotoxité des urines.

En conclusion : on observe une corrélation entre concentration urinaire élevée en Saposine B et gliotoxité. Ceci traduit l'implication de la protéine Saposine  
15 B dans le mécanisme de gliotoxité, seule ou en combinaison, sous sa forme naturelle ou modifiée mais reconnaissable par l'anticorps anti-saposine B utilisé pour le dosage.

La figure 17 représente le produit des concentrations en GM2AP et Saposine B en fonction de la gliotoxité des urines déterminée par test MTT.

20 Les 22 urines SEP (losanges gris), 5 urines AMN (losanges noirs) et 9 urines dites «Healthy » (losanges gris clair) des exemples 15 et 16 ont été reportés dans la figure 17. La gliotoxité de ces urines est analysée en fonction du produit des concentrations en GM2AP et Saposine B, c'est-à-dire en fonction de la co-détection des deux protéines dans les urines. On observe très nettement une corrélation entre le  
25 produit des deux concentrations GM2AP et Saposine B et la gliotoxité, bien plus importante qu'en ne considérant qu'une seule protéine. On observe que 5/5 des urines OND ont un produit de concentration GM2AP et Saposine B faible et une gliotoxité faible ; 8/9 urines « Healthy » ont un produit de concentration GM2AP et SaposineB faible et/ou une gliotoxité faible. Par contre, on distingue essentiellement trois sous-  
30 populations d'urines SEP :

- urines à faible concentration en GM2AP.Saposine B et faible gliotoxité (<15%),

- urines à forte concentration en GM2AP. Saposine B et forte gliotoxicité (>15%).

Ces deux sous populations traduisent peut-être des sous populations SEP, c'est-à-dire différentes formes ou stades de la maladie, différentes activités de la maladie, différents bénéfices thérapeutiques, .... Cependant il est très important de noter que toutes les urines présentant une forte concentration en GM2AP et Saposine B, c'est-à-dire ayant conjointement une forte concentration en GM2AP et Saposine B, présentent également une forte gliotoxicité. Les deux sous populations de patients SEP sont d'autant plus marquées et nettes que l'on considère conjointement les trois marqueurs : gliotoxicité, concentration élevée en GM2AP et concentration élevée en Saposine B. Ceci est confirmé à la figure 18.

En conclusion : on observe une corrélation entre concentration urinaire élevée de GM2AP et Saposine B et Gliotoxicité. Toutes les urines avec une forte concentration en GM2AP et Saposine B sont gliotoxiques, et toutes les urines avec une faible concentration en GM2AP et Saposine B ne sont pas gliotoxiques (<15%), à l'exception de 2 urines/22 SEP. Ceci traduit l'implication des deux protéines GM2AP et Saposine conjointement ou en combinaison dans le mécanisme de gliotoxicité, sous leur forme naturelle ou modifiée mais reconnaissable par les anticorps anti-GM2AP et anti-saposine B utilisés pour le dosage. De plus la co-détection d'une forte concentration urinaire en GM2AP et Saposine B et d'une forte gliotoxicité corréle avec une sous population de patients atteints de SEP (stade, forme, activité, traitement de la maladie ?), par rapport à une autre sous population. Ces trois marqueurs considérés conjointement permettent de discriminer entre deux sous populations de patients SEP.

Evolution de la gliotoxicité et des concentrations en GM2AP et Saposine B en fonction de l'évolution de la maladie de deux patients après et pendant traitement.

La corrélation entre gliotoxicité, forte concentration en GM2AP ET Saposine dans les urines et pathologie SEP a également été confirmée en mesurant ces trois paramètres dans l'urine de deux patients au cours de l'évolution de leur maladie.

Patient n°1 : SEP forme rémittente-progressive, hospitalisé à J0 pour une poussée et ayant reçu un flash de corticoïde à J1. Après le flash, il a montré une amélioration clinique jusqu'à J90 - (cf. figures 11,12),

Patient n°2 : SEP forme progressive, hospitalisé à J0 pour une poussée et ayant reçu un flash d'Endoxan (encore appelé cyclophosphamide) à J1. A J60, il présente de nouveaux des signes cliniques d'aggravation de sa maladie - (cf. figures 13,14).

5 Pour les deux patients, il a été montré :

- une corrélation entre la gliotoxicité urinaire et l'évolution clinique de la maladie (lorsque les signes cliniques sont sévères, la gliotoxicité est élevée ; lorsque les signes cliniques diminuent suite au traitement, la gliotoxicité diminue et devient stationnaire ; lorsque les signes d'aggravation apparaissent après le traitement, la  
10 gliotoxicité semble augmenter de nouveau),

- une corrélation entre le taux de gliotoxicité dans les urines de patients et les concentrations de GM2AP et Saposine B, et

- une corrélation entre les concentrations élevées de GM2AP et Saposine B et l'évolution clinique de la maladie.

15 En conclusion : le dosage des protéines GM2AP ET Saposine B dans les urines est un bon marqueur discriminatif d'une sous population de la SEP (stade, forme, activité, traitement de la maladie). Les protéines GM2AP et/ou Saposine B sont impliquées dans le mécanisme de gliotoxicité, seules ou en combinaison, sous leur forme naturelle ou sous une forme reconnaissable par les anticorps polyclonaux utilisés  
20 pour leur dosage. Comme les protéines GM2AP et Saposine sont co-détectées en forte concentration dans les urines gliotoxiques, il est possible que ces deux protéines agissent en combinaison pour induire la gliotoxicité.

Exemple 19 : Analyse immunohistochimique de l'expression des protéines  
25 GM2A, SAPB, MRP14 et MRP8 dans un système de culture producteur de gliotoxine in vitro (cultures de monocytes), ainsi que dans le tissu cérébral normal et pathologique de SEP et de témoins.

Protocole : Des cultures de monocytes d'un patient atteint de SEP et d'un témoin sain ont été réalisées en parallèle, selon le protocole présent décrit brièvement.  
30 A partir de sang périphérique de ces deux volontaires prélevé sur ACD, les PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) sont isolés sur Ficoll en utilisant la technique connue de l'homme de l'art. Les cellules récupérés (au niveau de l'anneau) sont lavées

deux fois en milieu RPMI. Les cellules sont alors énumérées sur Kova-slide et sont  
ensemencées en flacon primaire de 25 cm<sup>2</sup> ou sur lame Labtek (8 cupules) (en  
permanox) en milieu RPMI supplémenté avec 15% de sérum AB humain à J0. Les  
cellules sont cultivées sur des lames alvéolées de type « Labtek » afin de disposer d'un  
5 support direct pour l'analyse des monocytes qui adhèrent au support et se différencient  
ultérieurement en macrophages. Pour les lames,  $2 \cdot 10^6$  cellules sont ainsi ensemencées à  
raison de  $0,25 \cdot 10^6$  cellules/puits. Pour les flacons,  $4 \cdot 10^6$  cellules sont ensemencées à  
raison de  $0,25 \cdot 10^6$  cellules/puits. A J1, les cellules en suspension sont récupérées et les  
puits des Labtek ou les flacons sont lavés deux fois en RPMI (au préalable chauffé à  
10 37°C) avant de rajouter du milieu RPMI supplémenté avec 5% de sérum AB humain.  
A J1, J3, J6, J9, J12 ou 14, J15 le milieu de culture est changé ; les surnageants sont  
prélevés et les cellules fixées sur lames en utilisant les techniques connues de l'homme  
de l'art. A chaque changement de milieu, au moins deux lames ont été fixées en  
paraformaldéhyde et conservées pour l'analyse immunohistochimique.

15 Composition du milieu : RPMI (500 ml) avec 15ml de glutamate 200  
mM, 5 ml de pyruvate de sodium 100 µM, 5 ml d'acides aminés non essentiels (100x),  
des antibiotiques pénicilline et streptomycine 100 000 U /µl et des anticorps anti-  
interferon humains à 100 U/µl.

Résultats : Quatre cultures de monocytes *in vitro* ont été ainsi étudiées en  
20 cinétique : deux cultures de monocytes issus de sang d'individus contrôles et deux  
cultures de monocytes issus de patients SEP. A différents temps de la culture (J0, J1,  
J3, J6, J9, J12, ....), les surnageants correspondants ont été également récupérés. Une  
fois la cinétique complétée, les lames correspondant aux différents jours de cultures ont  
été incubées en présence d'anticorps polyclonaux anti-GM2A, SAP-B, MRP-8 et  
25 MRP14. La gliotoxicité de chaque surnageant ainsi récupéré a été estimée par test MTT.  
La concentration en protéine GM2AP, MRP14 et Saposine B a également été  
déterminée dans chaque surnageant par protocole Elisa comme décrit dans les  
exemples 13 et 14.

Les résultats d'immunofluorescence sur cellules fixées sont résumés ci-  
30 dessous ; on peut noter :

- une absence d'expression de MRP8 à tous les stades des 2 cultures

- une expression nette de MRP-14 dans la période entre J9 et J15, retrouvée dans les deux cultures, quoique plus forte dans la culture SEP. Cette expression semble corrélérer une étape de différenciation macrophagique.

- une très faible expression (faible intensité et faible nombre de cellules) est observée en début de culture dans la culture témoin et correspond vraisemblablement à la présence physiologique de GM2A dans les lysosomes macrophagiques.

- Dans la culture SEP, une expression beaucoup plus nette de GM2A (plus forte intensité et nombre de cellules plus important) est observée, avec un marquage cytoplasmique relativement homogène entre J3 et J6, disparaît à J9 et est à nouveau notée à J14-J15 avec un marquage intense et localisé à la périphérie cytoplasmique, dessinant le contour interne de la membrane plasmique. Ces observations ne sont pas retrouvées dans l'ensemble des lames témoins.

L'analyse avec le anticorps anti-SAP-B n'a pas permis d'obtenir un marquage immuno-histochimique interprétable.

Dans les cultures de monocytes SEP déjà effectuées, 3/3 ont présenté un pic de gliotoxicité à J9 et 2/3 un pic plus faible à J6. Aucun pic n'étant détecté dans les cultures de monocytes de 2/2 témoins non-SEP analysés en parallèle. De même, le dosage des protéines MRP14, GM2AP et Saposine B dans le surnageant des cultures cellulaires au cours de la cinétique a montré que les protéines SapB et GM2AP sont détectées par Elisa dans les surnageants des monocytes SEP et non dans ceux des monocytes témoins, aux jours J6 et surtout J9 de la culture ; les protéines ne sont pas détectées au-delà de cette cinétique. Notons que les anticorps utilisés pour le dosage peuvent reconnaître les formes physiologiques des protéines, mais également des formes complexées et/ou modifiées.

On constate donc que la période J6-J9 pendant laquelle on observe une gliotoxicité la plus importante dans le surnageant, est couverte par la période J3-J15 pendant laquelle on observe une production moins différenciée du témoin négatif de GM2A dans les cellules avec des fluctuations quantitatives et qualitatives de son expression cellulaire (quantité d'expression et localisation cellulaire).

Exemple 20: Technique d'immunohistologie sur coupes de cerveaux en paraffine.

Les coupes histologique préparées en paraffine sont déparaffinées en xylène et alcool avant de subir un prétraitement qui a pour but de démasquer les antigènes ; ce prétraitement peut correspondre à (i) deux fois 5 minutes sous micro-  
5 onde (750W) en présence d'un tampon citrate de sodium, acide citrique, (ii) un traitement à l'acide par incubation 15 minutes dans une solution d'acide périodique 1% ou par incubation 5 minutes dans une solution d'acide formique 99%. Les peroxydases endogènes sont ensuite bloquées par incubation des lames 30 minutes en eau oxygénée  
10 1% puis lavage extensif en eau pendant 15 minutes. Le bruit de fond est bloqué en incubant les lames 30 minutes en présence de PBS Triton 0.03%, 10% sérum Donkey (pour les anticorps polyclonaux) ou 10% sérum Goat (pour les anticorps monoclonaux). Un marquage avec l'anticorps primaire est réalisé en appliquant 100 à 200 µl de solution d'anticorps primaire par lame (0.5 à 5 µg /ml selon le titre) dans du  
15 PBS Triton 0.03% puis en incubant 2 heures à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées 3 fois en PBS-Triton pendant 10 minutes. Un marquage anticorps secondaire est réalisé en utilisant des anticorps biotinylés capables de se fixer spécifiquement aux anticorps primaires, par exemples des anti-IgG de lapin ou anti-IgG de souris dilués dans du PBS-Triton 0.03%. les lames sont lavées et incubées dans une  
20 solution pendant 2 heures (2 µl complexe streptavidine-biotine-peroxydes, 1600 µl PBS-Triton 0.03%). Les lames sont de nouveau lavées avant d'être révélées à l'abri de la lumière dans le tampon A puis rincées à l'eau avant observation microscopique. Tampon A pour 5 lames : 25 ml Tris 0.05M pH 7.6, 2.5 ml Imidazole 1M, 15 ml eau stérile, 2 ml DAB 5 mg/ml, 5 ml Nickel d'ammonium 10%, 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%.

25 Les mêmes anticorps ont été utilisés pour une étude immunohistochimique, selon la technique décrite brièvement ci-dessous, sur lames paraffinées obtenues par coupe au microtome de cerveaux prélevés post-mortem de SEP et de témoins décédés de pathologies non-neurologiques.

Les résultats de l'analyse sont résumés ci-dessous :

30 Il n'y a pas de marquage des cerveaux « non-SEP » et SEP dans la substance grise et la substance blanche « normale (non lésée) avec les différents anticorps anti- MRP8, MRP14, GM2A. Une réactivité non spécifique n'a pas permis



d'interpréter les résultats avec l'anticorps anti-saposine B dans cette application immunohistochimique.

Par contre on note, dans les zones de plaques des cerveaux SEP :

- une réactivité anti-MRP14 dans les cellules macrophagiques et microgliales, ayant une distribution relativement homogène sur toute l'étendue des zones de démyélinisation (plaques),
- une plus faible (moins fréquente) réactivité anti-MRP8 liée essentiellement aux infiltrats lymphoïdes périvasculaires
- une nette réactivité anti-GM2A dans les macrophages et microgliocytes des zones de plaques, avec une densité particulière dans les zones constituant le « mur glial » en limite périphérique de plaque. Un marquage de quelques astrocytes a aussi été retrouvé dans les zones de démyélinisation.

Ces différentes observations montrent qu'il existe une hyperexpression particulière des protéines MRP-14 et GM2A dans les cultures de monocytes de SEP produisant une activité gliotoxique dans leur surnageant, ainsi que dans les zones définissant des plaques de démyélinisation dans les cerveaux de SEP. Elles témoignent donc de la réalité de la coïncidence entre leur co-expression anormale, la production d'activité gliotoxique et les lésions de démyélinisation.

De plus, leur production anormale dans le contexte de la SEP, dans les cellules macrophagiques sanguines ainsi que dans celles du cerveau, indique qu'il est fondé de réaliser leur dosage dans les fluides biologiques pour corréler leur quantité avec l'activité lésionnelle et inflammatoire de la SEP.

Exemple 21 : Mesure de l'activité des cellules T par prolifération des cellules T (Sredni et al., 1981).

Les cellules T sont lavées deux fois en milieu de culture pour éliminer toute trace d'IL2 présente dans le milieu initial de culture. Des lymphocytes B (EBV-LCL) ou des monocytes/macrophages pris comme cellules présentatrices de l'antigène, sont irradiées à 10000 rads, lavées deux fois avec du milieu de culture (RPMI).  $2 \cdot 10^4$  cellules T ( $2 \cdot 10^5$  cellules /ml) et  $2 \cdot 10^4$  cellules B autologues irradiées ( $2 \cdot 10^5$  cellules /ml) sont incubées ensemble en présence d'une gamme de concentration croissante de

l'antigène sous un volume final de 200 µl dans des micropuits. Après 48 heures de culture à 37°C, 1 µCi de 3H- thymidine dans 50 µl de milieu RPMI est ajouté dans chaque puits. Les cellules T, seules à se diviser, incorporent la thymidine tritiée dans l'ADN. Après 18 heures de culture, les cellules de chaque micropuits sont récoltées sur des pastilles de laine de verre par aspiration. Après lyse osmotique des cellules, la radioactivité incorporée dans l'ADN est absorbée sur les pastilles (cell Harvester 530, Inotech). Chaque pastille séchée est placée dans un tube plastique qui contient 2 ml de scintillant ; la radioactivité adsorbée sur chacune des pastilles est quantifiée dans un compteur bêta à scintillation liquide (LKB Rackbeta 1217). Les résultats sont exprimés  
10 comme moyenne arithmétique de cpm/culture ('coups par minute').

Exemple 22 : Protocole de détection de l'association entre les peptides et les molécules d'histocompatibilité (approche APC transformées avec un peptide se fixant au CMH I).

15 1) Matériel :

Les sources de molécules d'histocompatibilité sont actuellement de deux types principaux : les cellules mutantes et les molécules d'histocompatibilité purifiées.

La cellule mutante utilisée est la cellule humaine T2 qui est un variant de la lignée T1 produite par fusion du lymphome T CEM et du lymphome B 721.174 (Salter and Cresswell Embo J 1986, 5: 943-949). Cette cellule qui est dépourvue de transporteurs de peptides contient des chaînes lourdes de molécules de classe I libres de peptides qui vont pouvoir accepter de peptides exogènes.  
20

Des molécules d'histocompatibilité de classe I purifiées par chromatographie d'affinité à partir de lignées de cellules B humaines transformées par l'EBV peuvent être également utilisées. Dans ce cas les peptides endogènes doivent être éliminés par un traitement avec de l'urée 1.5 M et de la soude 12.5 mM (pH 11.7) pendant 1 heure à 4°C, suivi de leur élimination par une colonne de désalage (PDLO, Pharmacia). Les molécules d'histocompatibilité sont immédiatement remises en présence des peptides à tester dans un tampon PBS avec 0.05% Tween 20, 2 mM  
25 EDTA, 0.1% NP40 et 6mM CHAPS, en présence de 2µg/ml B2m pour faciliter la réassociation (Gnjatic et al., Eur J Immunol 1995 25 : 1638-1642).  
30

Les peptides testés ont en général 8 à 10 résidus, parfois 11 ou 12. Ils ont été synthétisés par Néosystems (Strasbourg), ou par Chiron mimotopes (Victoria, Australie). Ils sont utilisés à des concentrations variant de 100  $\mu$ M à 0.1 nM.

2) Protocole de l'assemblage (Connan et al., Eur J Immunol 1994, 24 : 777 ; Couillin et al. Eur J Immunol 1995, 25 : 728-732).

Des aliquotes de 8.105 cellules dans un volume de 64  $\mu$ l, répartis dans des tubes microfuge Eppendorf, sont mis en présence d'un tampon de lyse contenant 10 mM PBS, pH 7.5 1% NP40, des inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 100  $\mu$ M iodoacétamide, 2  $\mu$ g /ml aprotinine, 10  $\mu$ M leupeptine, 10  $\mu$ M pepstatine et 10  $\mu$ g/ml inhibiteur de trypsine). La lyse se fait en présence des peptides à tester pendant 30 minutes ou 1 heure à 37°C. Après élimination du matériel non solubilisé par une centrifugation à 15 000 tours /minute à 4°C, le surnageant est additionné de 140  $\mu$ l de PBS contenant 0.05% de Tween 20, 3 mM d'azide de sodium, 1 mM PMSF et 10 mg /ml d'albumine bovine. Chaque échantillon est incubé pendant 20 heures à 4°C dans 2 puits d'une plaque à microtitration de type Nunc,Maxisorb, préalablement recouverts d'un anticorps monoclonal (10  $\mu$ g /ml en PBS) qui reconnaît les molécules d'histocompatibilité ayant une(des) conformation(s) conforme(s) pour la présentation de peptides et semblable(s) à celle(s) présente(s) à la surface des cellules. La plaque recouverte d'anticorps est préalablement saturée par de l'albumine bovine à 10 mg /ml dans du PBS-Tween avant la mise de l'échantillon. Le second anticorps qui permet la détection de l'assemblage des molécules d'histocompatibilité est dirigé contre la B2m. Il est couplé soit à la biotine (NHS-LC biotin, Pierce) soit à la phosphatase alcaline (P-552, Sigma) et est incubé à 2  $\mu$ g /ml pendant une heure à 37°C. Dans le cas de l'emploi de la biotine, une incubation de 45 minutes à 20-25°C avec de la streptavidine couplée à la phosphatase alcaline (E-2636, Sigma) est réalisée. L'activité de la phosphatase alcaline est mesurée en utilisant comme substrat le 4-méthyl-umbelliféryl-phosphate (M-8883, Sigma) à 100  $\mu$ M dans de la diéthanolamine 50 mM, pH 9.5 avec du MgCl<sub>2</sub> 1 mM. La lecture est faite à 340/460 nm à l'aide d'un cytofluorimètre.

### 3) Stabilité des complexes HLA/peptides :

La stabilité des complexes précités a été étudiée car elle conditionne la bonne présentation de l'antigène et l'induction de la réponse T. A cet effet, on a utilisé soit du HLA purifié, soit le lysat de la cellule T2. Avec le HLA purifié, on a éliminé les

peptides endogènes (comme décrit en 2)) puis on l'a mis en présence du peptide à tester en tube Eppendorf à 37°C, pendant des temps variables de quelques minutes à plusieurs jours. La phase suivante d'incubation sur plaque de 96 puits (comme décrit en 2) avec l'anticorps anti-HLA se fait pendant une heure à 37°C. La révélation est effectuée de  
5 manière classique. Avec le lysat de la cellule T2, toutes les incubations sont également faites à 37°C, après ajout de tous les inhibiteurs de protéases.

## REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

2. Utilisation d'au moins deux polypeptides en combinaison, lesdits polypeptides comprenant chacun au moins un fragment d'une protéine, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à une séquence peptidique choisie parmi SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine

plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

3. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

4. Utilisation selon la revendication 3, de cinq polypeptides en combinaison, lesdits polypeptides comprenant chacun au moins un fragment d'une protéine, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la séquence peptidique dudit polypeptide comprend une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la séquence peptidique dudit polypeptide consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 17 et SEQ ID N° 24.

7. Utilisation d'un fragment polypeptidique défini dans la revendication 1 ou dans la revendication 3 pour la préparation d'un peptide immunogène, caractérisé en ce que ledit peptide comprend tout ou partie d'au moins une des séquences référencée SEQ ID N° 58 à 65.

5 8. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments qui codent pour au moins un fragment  
10 d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ  
15 ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29, les fragments complémentaires desdits fragments et les  
20 fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

25 9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit fragment nucléotidique code pour ladite protéine.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que la séquence peptidique de ladite protéine à l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29 et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies  
30 parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

11. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un  
5 fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N°  
10 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70 et SEQ ID N° 71 et leurs séquences complémentaires.

12. Utilisation d'un ligand spécifique d'un polypeptide ou d'un fragment nucléotidique selon l'une quelconque des revendications précédentes pour obtenir une  
15 composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune. .

13. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la maladie dégénérative et/ou auto-immune est la sclérose en  
20 plaques.

14. Procédé pour détecter au moins une protéine associée à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique d'au moins un polypeptide, ledit polypeptide comprenant au moins un fragment d'une  
25 protéine et ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N°  
30 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29 et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 %



d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que ledit ligand est un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

10 16. Procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, 15 SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5 SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui 20 présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique 25 de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que le ligand est un anticorps, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit 30 polypeptide est un cofacteur.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisé en ce que la séquence dudit polypeptide comprend une séquence peptidique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisé en ce que la séquence dudit polypeptide consiste en une séquence peptidique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 8 et SEQ ID N° 10 à 29.

20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 19, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est l'urine, le liquide céphalo-rachidien ou le sérum.

21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 20, caractérisé en ce que la maladie dégénérative et/ou auto-immune est la sclérose en plaques.

22. Polypeptide caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment d'une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9, ledit fragment comprenant au moins une mutation par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8.

23. Polypeptide selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux mutations par rapport à la séquence de référence SEQ ID N° 8.

24. Polypeptide selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les polypeptides qui comprennent la séquence en acides aminés FSWDNCFEGKDPVIR, référencée SEQ ID N° 68 et la séquence en acides aminés YSLPKSEFAVPDLELP, référencée SEQ ID N° 72.

25. Polypeptide selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisé en ce qu'il comprend une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9.

26. Polypeptide selon l'une des revendications 22 à 25, caractérisé en ce qu'il consiste en une protéine dont la séquence peptidique correspond à SEQ ID N° 9.

27. Utilisation d'au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 22 à 26 pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

28. Utilisation selon la revendication 26, caractérisée en ce que le polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26 est utilisé

en mélange avec au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5.

29. Procédé pour détecter au moins un ligand associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce que  
5 l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et le ligand.

30. Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que l'on met en  
10 contact l'échantillon biologique avec un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26 et avec au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5.

31. Procédé selon la revendication 29 ou 30, caractérisé en ce que ledit  
15 ligand est un anticorps, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

32. Procédé pour détecter au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26 dans un échantillon biologique caractérisé  
20 en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un ligand spécifique dudit polypeptide, puis on détecte la formation d'un complexe entre ledit polypeptide et ledit ligand.

33. Procédé selon la revendication 32, caractérisé en ce que ledit ligand est  
25 anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

34. Procédé selon la revendication 30 ou 31, caractérisé en ce que l'on met en contact l'échantillon biologique avec un ligand tel que défini dans l'une quelconque  
30 des revendications 31 et 33 et au moins un ligand spécifique d'au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5, puis on détecte la

formation de complexes entre lesdits polypeptides et lesdits ligands spécifiques desdits polypeptides.

35. Procédé selon la revendication 34, caractérisé en ce que le ligand est  
5 un anticorps monoclonal, un anticorps polyclonal, un récepteur, un substrat d'activité enzymatique ou une enzyme dont ledit polypeptide est un cofacteur.

36. Fragment nucléotidique caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 22 à 26.

10 37. Utilisation d'un fragment nucléotidique pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, pronostiquer, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est le  
15 fragment nucléotidique défini dans la revendication 35, éventuellement en association avec au moins un fragment nucléotidique tel que défini dans l'une quelconque des revendications 8 à 11, et les fragments complémentaires desdits fragments.

38. Procédé selon l'une quelconque des revendications 29 à 35, caractérisé  
20 en ce que l'échantillon biologique est l'urine, le liquide céphalo-rachidien ou le sérum.

39. Procédé selon l'une quelconque des revendications 29 à 36 caractérisé en ce que la maladie dégénérative et/ou auto-immune est la sclérose en plaques.

25 40. Procédé pour détecter au moins un polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou dans l'une quelconque des revendications 22 à 26, selon lequel on prélève un échantillon d'un fluide biologique d'un patient présentant un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune et éventuellement après purification dudit échantillon de fluide  
30 biologique, on analyse par spectrométrie de masse le profil de masse obtenu à partir du fluide biologique et on compare à un profil de masse de référence.

41. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 8 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B, et de préférence SEQ ID Nos :8, 9, 17 et 24.

42. Utilisation, selon la revendication 41, dans laquelle les séquences peptidiques sont comprennent les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2 et de la saposine B.

43. Utilisation, selon l'une quelconque des revendications 41 ou 42, qui est associée à l'utilisation d'une détection d'une activité gliotoxique.

44. Procédé de diagnostic ou de pronostic dans lequel on dose au moins un polypeptide, selon l'une quelconque des revendications 41 à 43, pour détecter ou prévenir un état pathologique, le dosage permettant d'obtenir une valeur de concentration qui est comparée à une valeur seuil représentative d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

45. Procédé, selon la revendication 44, dans lequel la valeur seuil est obtenu par un test ELISA pour un échantillon d'urine, cette valeur étant de :

- 400 ng/ml pour le précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, pour l'anticorps GM2AP84, et
- 2 µg/ml pour la saposine B, pour l'anticorps SAPB84.

5                    46. Procédé de diagnostic ou de pronostic dans lequel on détecte au moins un polypeptide, selon l'une quelconque des revendications 41 à 43, pour prévenir un état pathologique, la détection s'effectuant dans des cellules ou dans les surnageants desdites cellules d'un patient susceptible d'être atteint par une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

10                   47. Procédé, selon la revendication 46, dans lequel la détection s'effectue sur des cellules monocytes ou macrophages ou dans les surnageants de ces cellules issues d'un patient susceptible d'être atteint par une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

15                   48. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 46 ou 47, dans lequel la détection s'effectue sur des cellules ou dans les surnageants de ces cellules en culture, après un délai compris entre 6 et 12 jours de culture, préférentiellement après 9 jours.

20                   49. Procédé, selon l'une quelconque des revendications 46 ou 47, dans lequel la détection s'effectue sur des cellules, in vivo ou ex vivo, préférentiellement monocytes ou macrophages, dans des cerveaux de patient susceptible d'être atteint par une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

25                   50. Utilisation ou procédé, selon l'une quelconque des revendications 41 à 49, caractérisée en ce que la maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune est la sclérose en plaques ou bien une forme (progressive, rémittente, rémittente-progressive) ou phase d'activité (poussées) de cette maladie.

30                   51. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique, ladite

protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

52. Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline et de la saposine.

53. Utilisation selon la revendication 51 ou 52, caractérisée en ce que le polypeptide est choisi parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24.

54. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester  
5 l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi les fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ  
10 ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui  
15 présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine  
20 plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

55. Utilisation pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments  
25 nucléotidiques définis à la revendication 54.

56. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative  
30 et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, selon laquelle ledit fragment nucléotidique est choisi parmi des fragments qui codent pour au moins un fragment d'une protéine, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la



séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les fragments complémentaires desdits fragments et les fragments qui codent pour les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisie parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

57. Utilisation pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques, de protéines recombinantes et/ou codées par tout ou partie des fragments nucléotidiques définis à la revendication 56.

58. Utilisation selon la revendication 54 ou 56, caractérisée en ce que ledit fragment nucléotidique code pour ladite protéine.

59. Utilisation selon la revendication 58, caractérisée en ce que la séquence peptidique de ladite protéine à l'état natif consiste en une séquence choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 1 à 29, les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

60. Utilisation selon la revendication 59, caractérisée en ce que les polypeptides sont choisis parmi SEQ ID N° 2, 4, 8, 9, 17, 24.

61. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique, pour tester l'efficacité d'un agent thérapeutique pour un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

15

62. Utilisation d'au moins un fragment nucléotidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, telle que la sclérose en plaques selon laquelle ledit fragment est un fragment d'une séquence nucléique choisie parmi l'une quelconque des SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N° 39, SEQ ID N° 40, SEQ ID N° 41, SEQ ID N° 42, SEQ ID N° 43, SEQ ID N° 44, SEQ ID N° 45, SEQ ID N° 46 et SEQ ID N° 47, SEQ ID N° 48, SEQ ID N° 49 et SEQ ID N° 50, SEQ ID N° 51, SEQ ID N° 52, SEQ ID N° 53, SEQ ID N° 54, SEQ ID N° 55, SEQ ID N° 56, SEQ ID N° 57, SEQ ID N° 66, SEQ ID N° 67, SEQ ID N° 69, SEQ ID N° 70, SEQ ID N° 71, et leurs séquences complémentaires.

20  
25

63. Utilisation selon la revendication 61 ou 62, caractérisée en ce que la séquence nucléique est choisie parmi SEQ ID N° 30, 31, 42, 53.

30

64. Utilisation de la lycorine pour la préparation d'une composition pour la prévention et/ou le traitement de maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune.

# Lapins anti GM2

## ➤ Ganglioside GM2 activator

2 peptides de 13,15 acides aminés    lapins 189 190

1 peptide de 18 acides aminés lapin    191 et 192

**MQSLMQAPLL IALGLLLATP AQAHKKPSQ**  
**LSSFWDNCD EGKDPVIRS LTLEPDPIV**  
**PGNVTLSVVG STSVPLSSPL KVDLVLEKEV**  
**AGLWIKIPCT DYIGSCTFEH FCDVLDMLIP**  
**TGEPCEPLR TYGLPCHCPF KEGTYSLPKS**  
**EFVVPDLELP SWLTTGNYRI ESLSSSGKR**  
**LGCikiaASLKGi**

### GM2A

ATG CAG TCC CTG ATG CAG GGT CCC CTC CTG ATC GGC CTG GGC TTG CTT CTC GCG AGC CCT GCG CAA GCC CAC CTG  
M Q S L H Q A P L L I A L G L L L A T P A T P A Q A H L  
CCA TCC CAG CTC AGT AGC TTT TCC TGG GAT AAC TGT CAT GAA GGG AAG GAC CCT GCG CTG ATC AGA AGC CTG ACT  
P S Q L S S F S W D N C D E G K D P A V I R S L T  
CCT GAC CCC ATC GTC GTT CCT GGA AAT GTG ACC CTC AGT CTC GTG GGC AGC ACC AGT GTC CCC CTG AGT TGT CCT  
P D P I V V P G N V T L S V G S T S V P L S S P  
CTG GAT TTA GTT TTG GAG GAG GTG GCT GGC CTC TGG ATC MAG ATC CCA TGC ACA GAC TAC ATT GGC AGC TGT  
V D L V L E K E V A G L I K I P C T D Y I G S C  
GAA CAC TTC TGT GAT GTG CAT GAT GAG ATG TTA ATT CCT ACT GCG GAG CCC TGC CCA GAG CCC CTG CGT ACC TAT GGG  
E H F C D V L H L I P T G E P C P L R T Y G  
TGC CAC TGT CCC TTC AAA GAA ACC TAC TCA CTG CCC AAG AGC GAA TTC GTT GTG CCT GAC CTG GAG CTG CCC  
F C H C P F K E G T Y S L P K S E V V P D L E L P  
CTC ACC ACC GGG AAC TAC CCG ATA GAG AGC GTC CTG AGC AGC AGT GGG AAG CGT CTG GCG TGC ATC AAG ATC GGT  
L T T G N Y R I E S V L S S G K K R L G C I K I A  
CTA AAG GGC ATA  
L K G I

FIG. 1

Lapins anti MRP14

2 peptides de 13, 19 acides aminés lapin 193  
1 peptide de 17 acides aminés lapin 195-196

MTCKMSQLER NIETIINTFH QYSVKLGHPD  
TLNQGEFKEL VRKDLQNFLK KENKNEKVIE  
HIMEDDLDTN ADKQLSFEEF IMLMARLTWA  
SHEKMHEGDE GPGHHHKPGL GEGTP

MRP1

ATG ACT TGC AAA ATG TCG CAG CTG GAA CGC AAC ATA GAG ACC ATC ATC AAC ACC TTC CAC CAA TAC TCT GTG AAG CTG GGG CAC CCA  
M T C K H S Q L E R N I E T I I N T F H Q Y S V K L G H  
CTG AAC CAG GGG GAA TTC AAA GAG CTG GTC CGA AAA GAT CTG CAA AAT TTT CTC AAG AAG GAG AAT AAG AAT GAA AAG CTC ATA  
L N Q G E F K E L V R K D L Q N F L K K E N K N E K V I E  
ATG CAG GAC CTG CAC ACA AAT GCA GAC AAG CAG CTG AGC TTC GAG GAT ATC ATG CAG AGG CTA ACC TGG GGC TCC CAC  
M E D L D I N A D K Q L S F E E F I M L M A R L T W A S H  
ATG CAC GAG GGT CAC GAG GGC CCT GGC CAC CAT AAG CCA GGC CTC GGG CAG GGC ACC CCC  
N H E G D E G P G H H K P G L G E G T

FIG. 2

Lapin anti Saposine

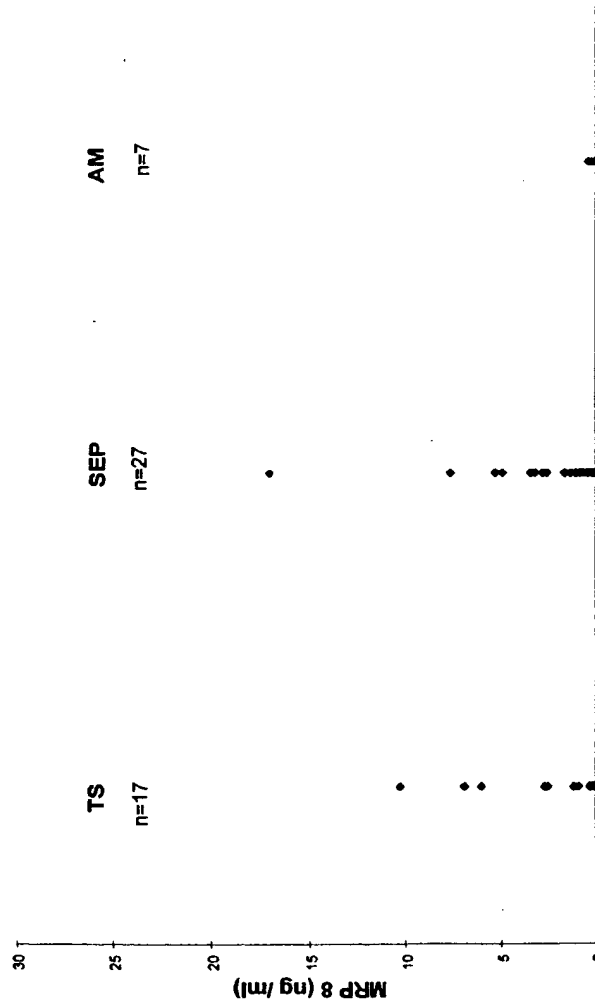
3 peptides de 12,15, 15 acides aminés    lapin 74-75  
3 peptides de 12,15,15 acides aminés    lapin 72-73

GDVCQDCIQM VTDIQTAVRT NSTFVQALVE  
HVKEECDRLG PGMADICKNY ISQYSEIAIQ  
MMMHHMQDQQP KEICALVGFC DEV

Sap  
ATG GGG GAC GTT TGC CAG GAC TGC ATT CAG ATG GTG ACT GAC ATC CAG ACT GCT GTA CGG ACC AAC TCC ACC TTT GTC CAG  
GCC  
M G D V C Q D C I Q M V T D I Q T A V R T N S T F V Q  
A  
TTG GTG GAA CAT GTC AAG GAG GAG TGT GAC CCG CTG GGC CCT GGC ATG GCC GAC ATA TGC AAG AAC TAT ATC AGC CAG TAT  
TCT  
L V E H V K E E C D R L G P G M A D I C K N Y I S Q Y  
S  
GAA ATT GCT ATC CAG ATG ATG CAC ATG CAA CCC AAG GAG ATC TGT GCG CTG GTT GGG TTC TGT GAT GAG TGA  
E I A I Q M M M H M Q P K E I C A L V G F C D E \*

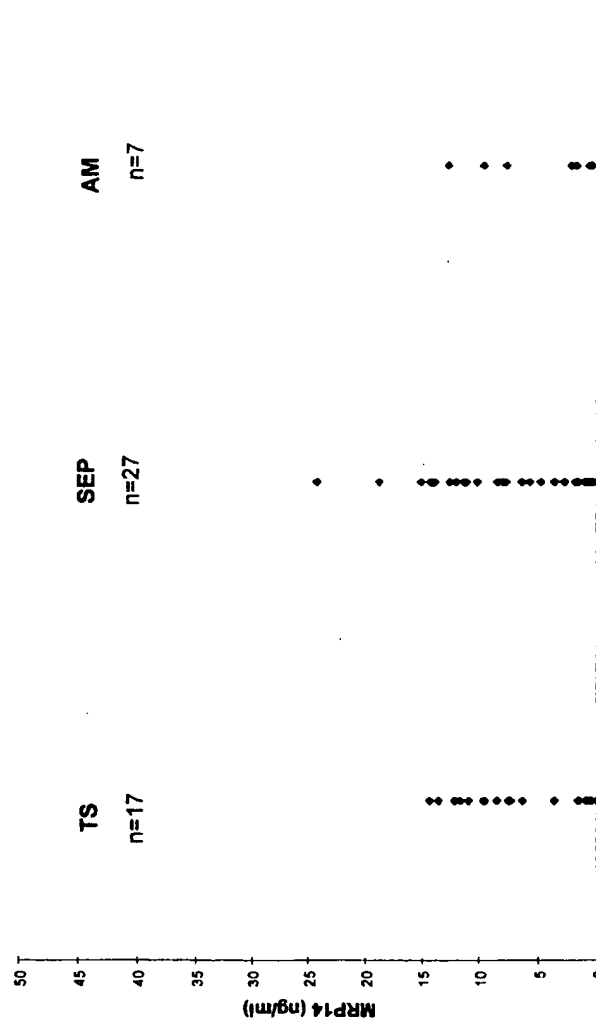
FIG. 3

# Dosage MRP 8



5/18

# Dosage MRP14

FIG. 5



6/18

# Dosage MRP8/14

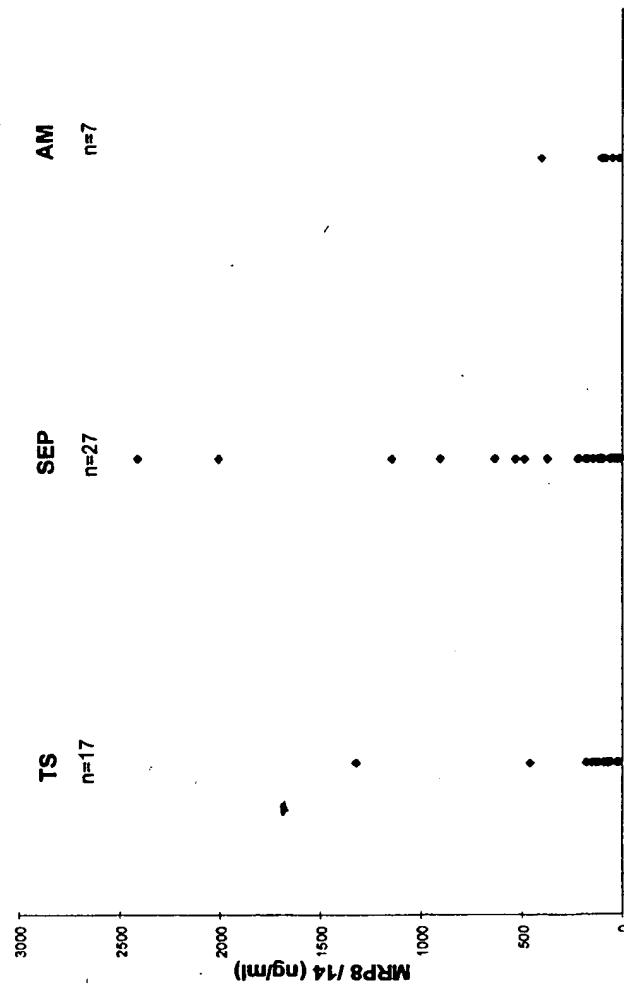


FIG. 6

7/18

# Taux urinaire moyen par catégorie de population

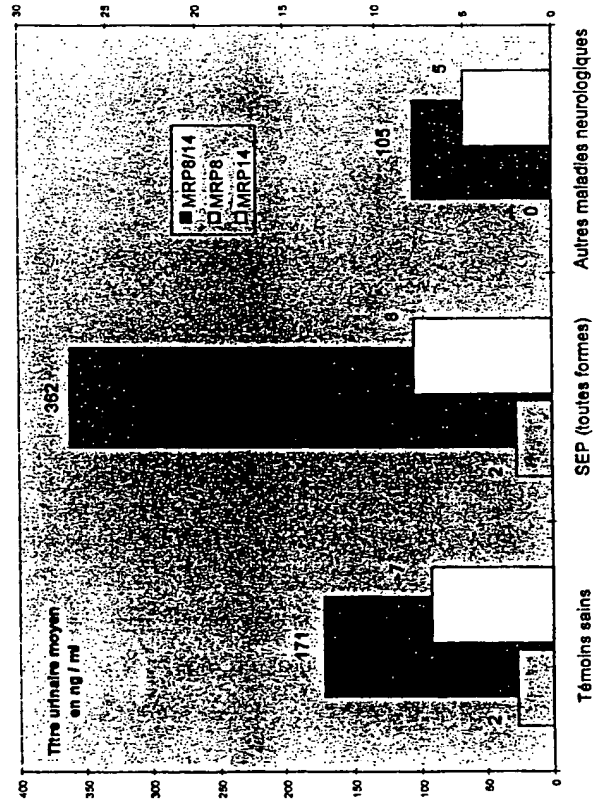
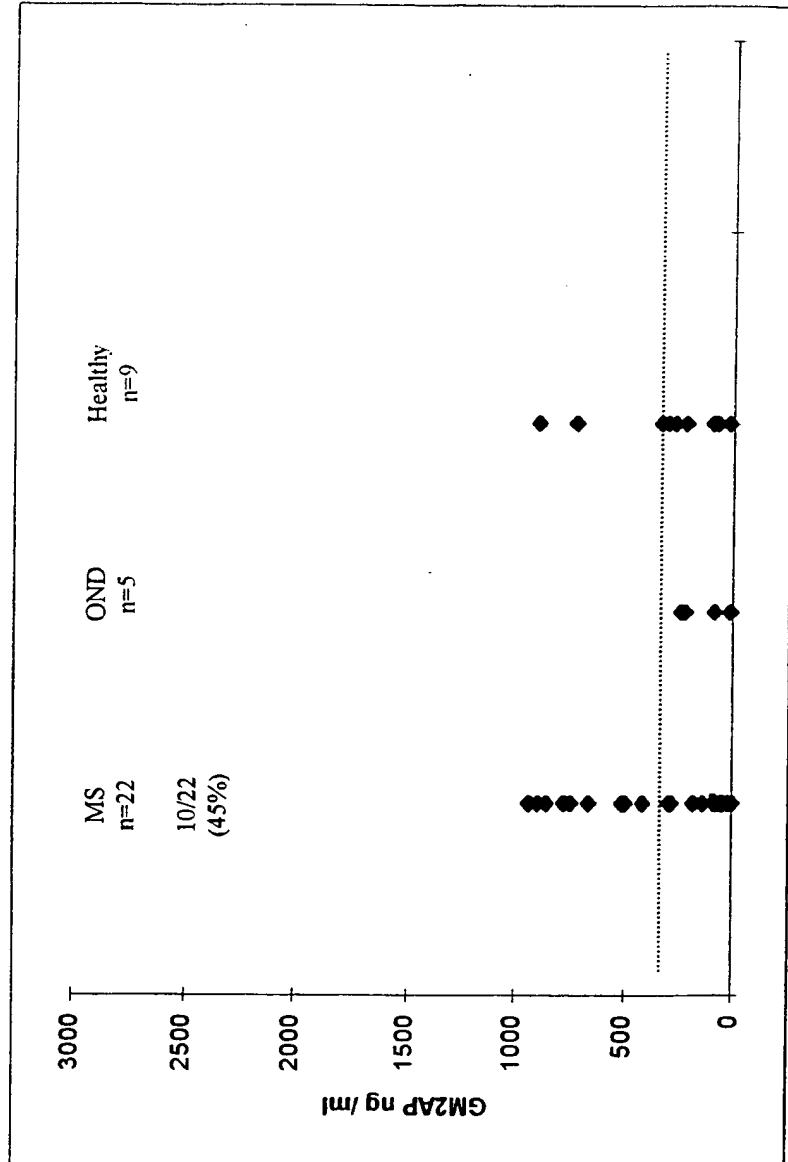


FIG. 7

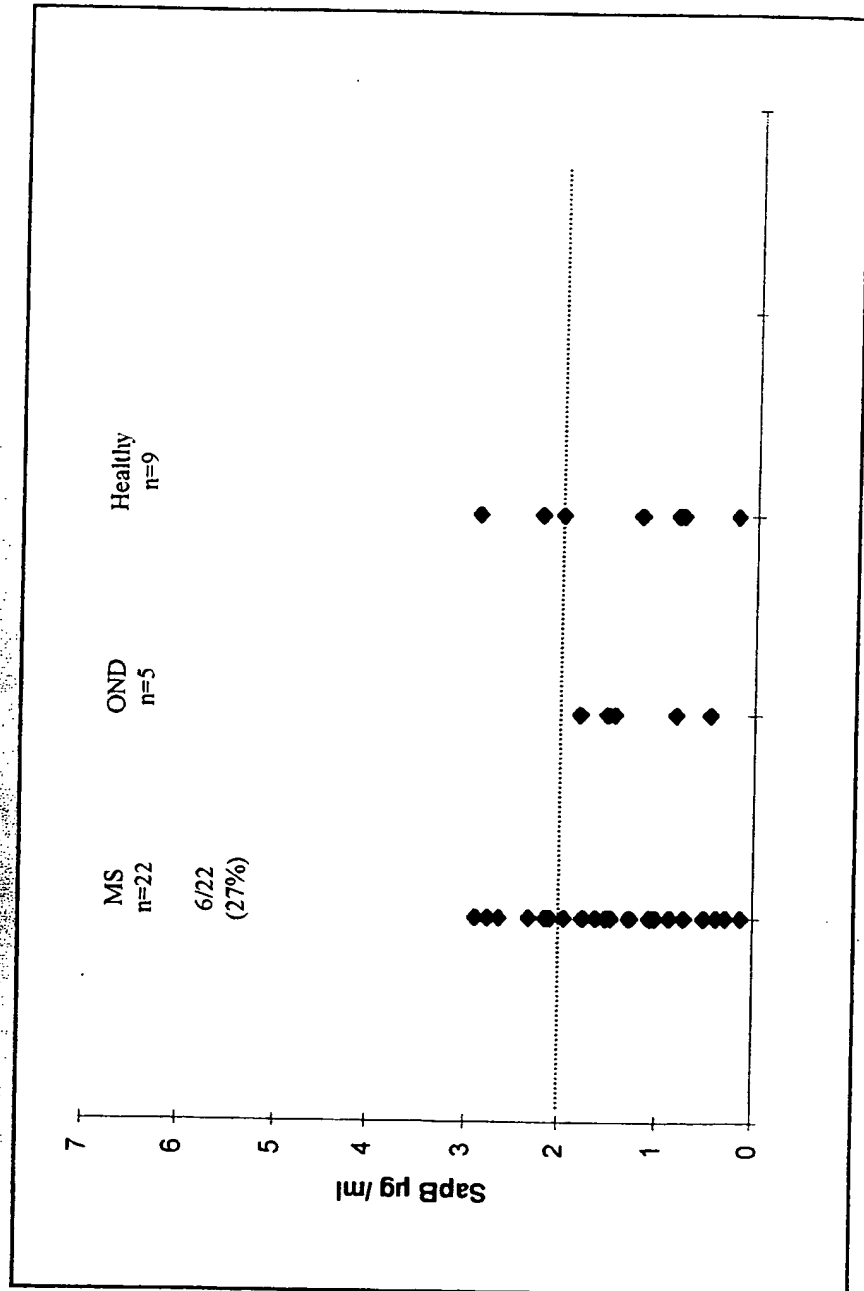
8/18

**Figure 8**



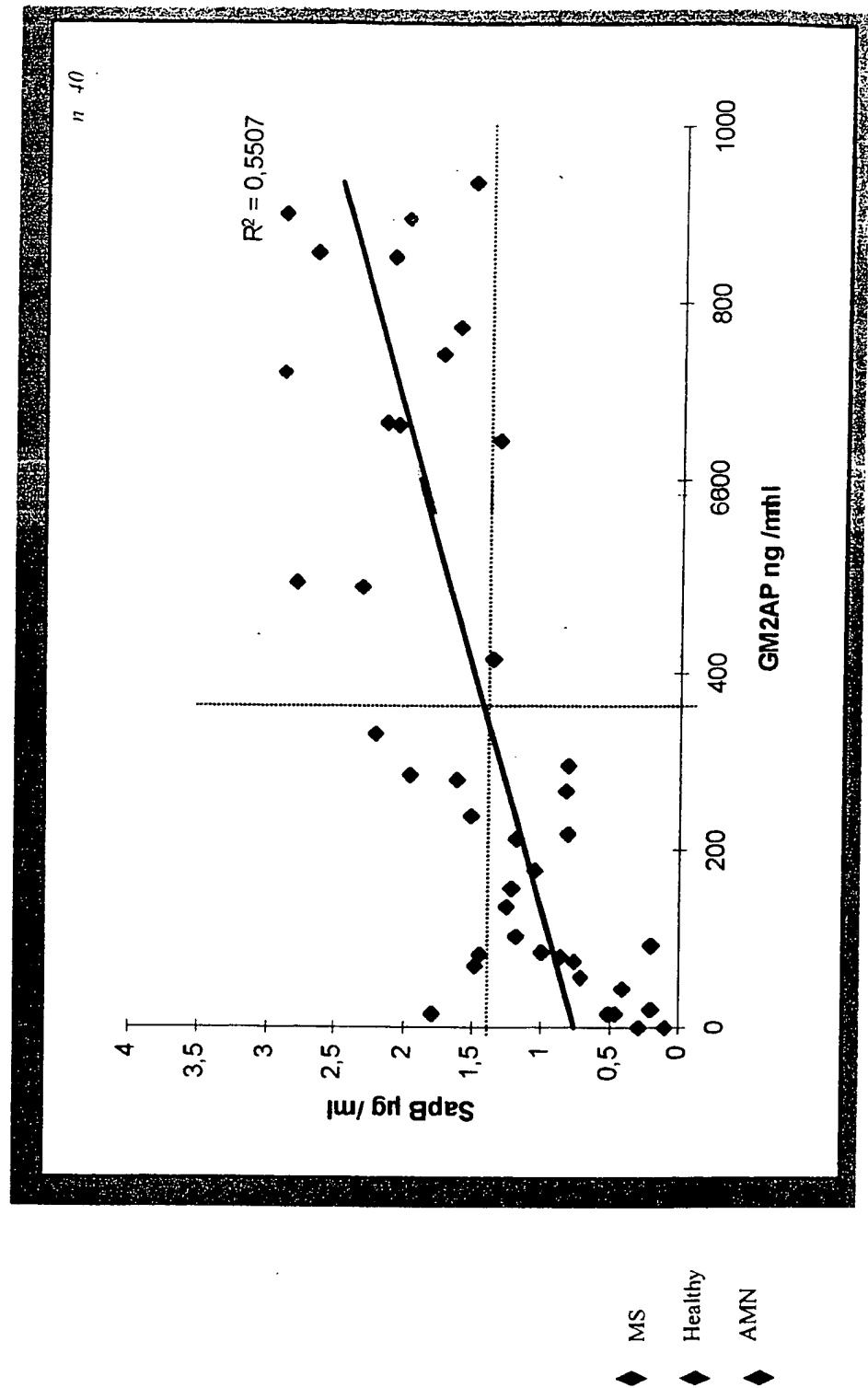
9/18

Figure 9



10/18

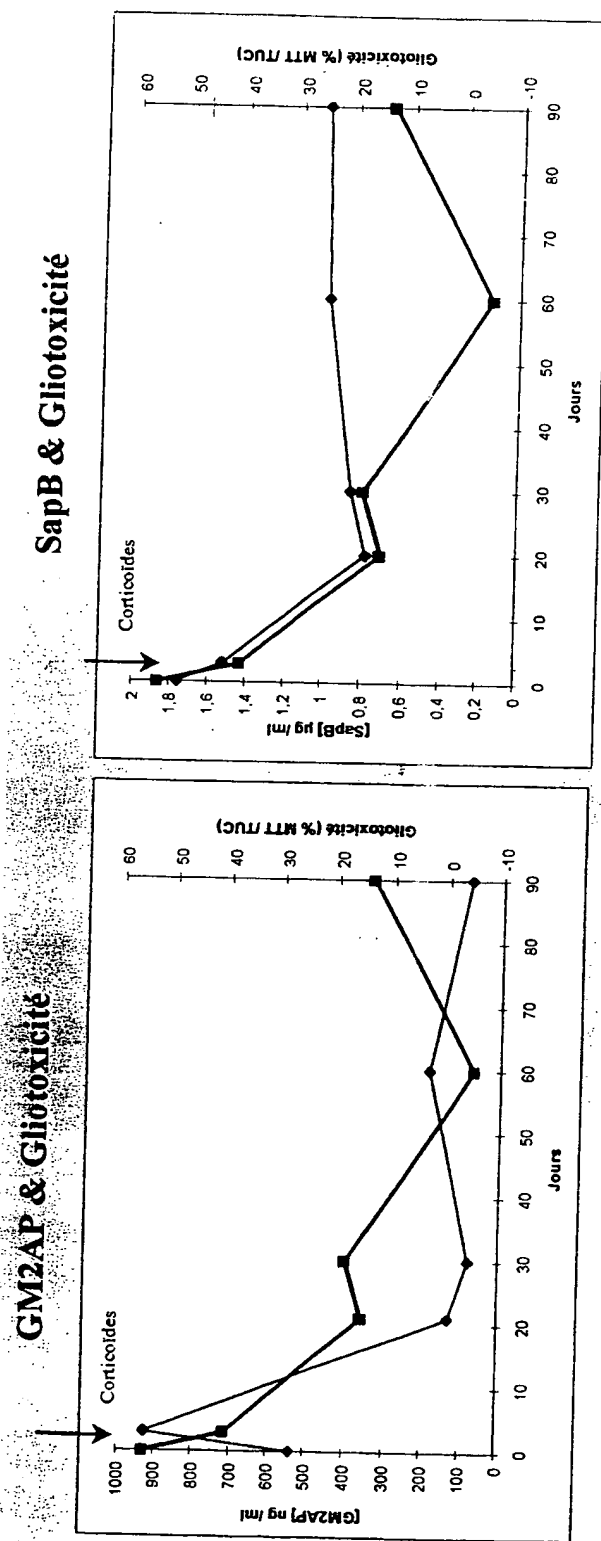
Figure 10



11/18

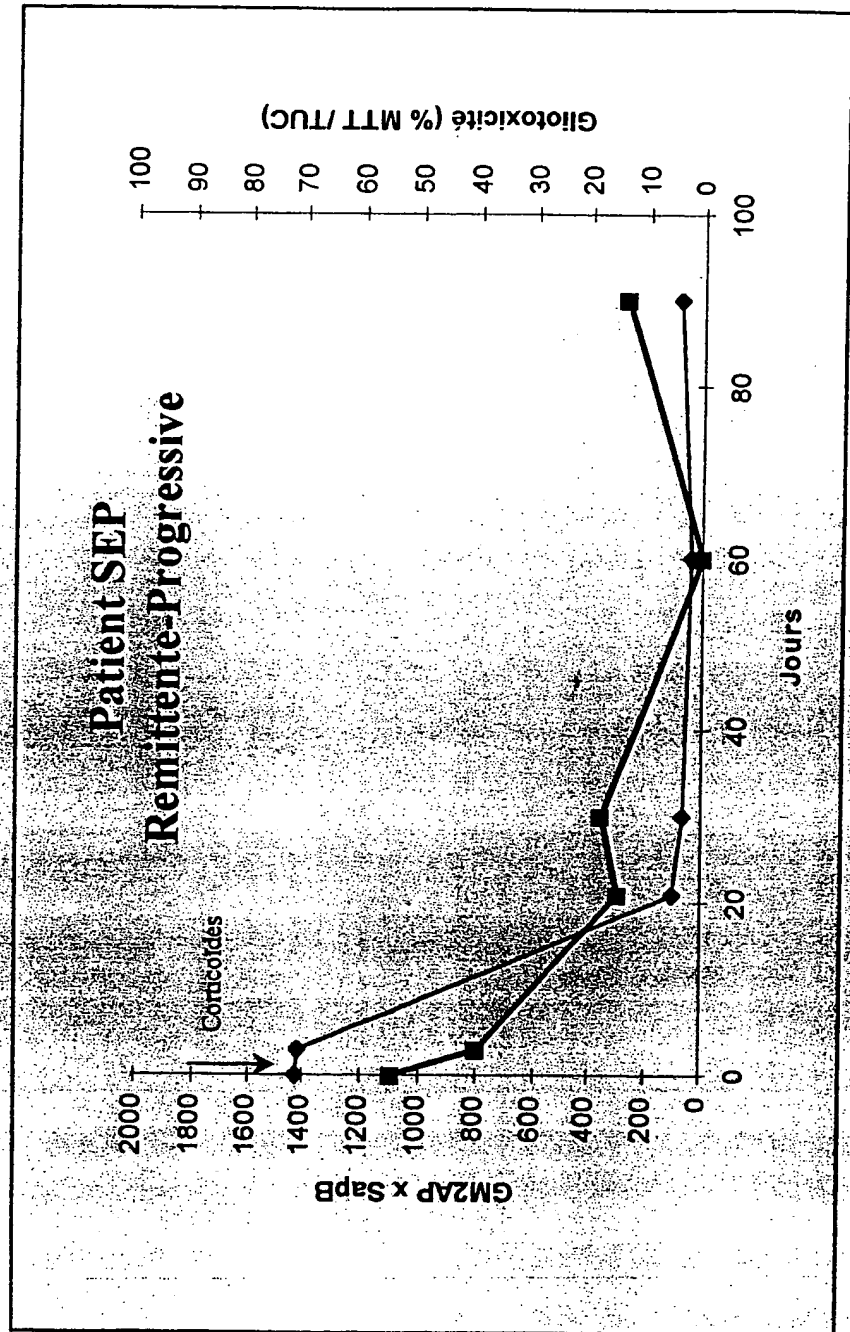
**Figure 11**

**Patient SEP forme Rémittent Progressive**



12/18

Figure 12



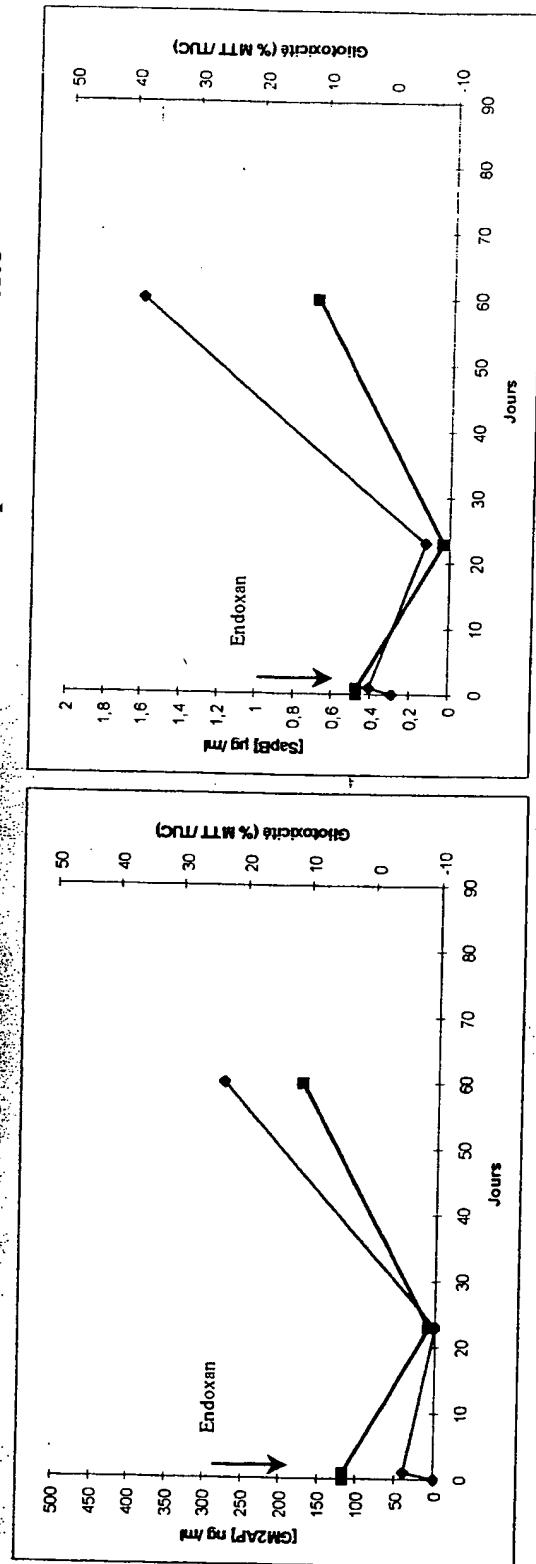
13/18

Figure 13

Patient SEP - Progressive

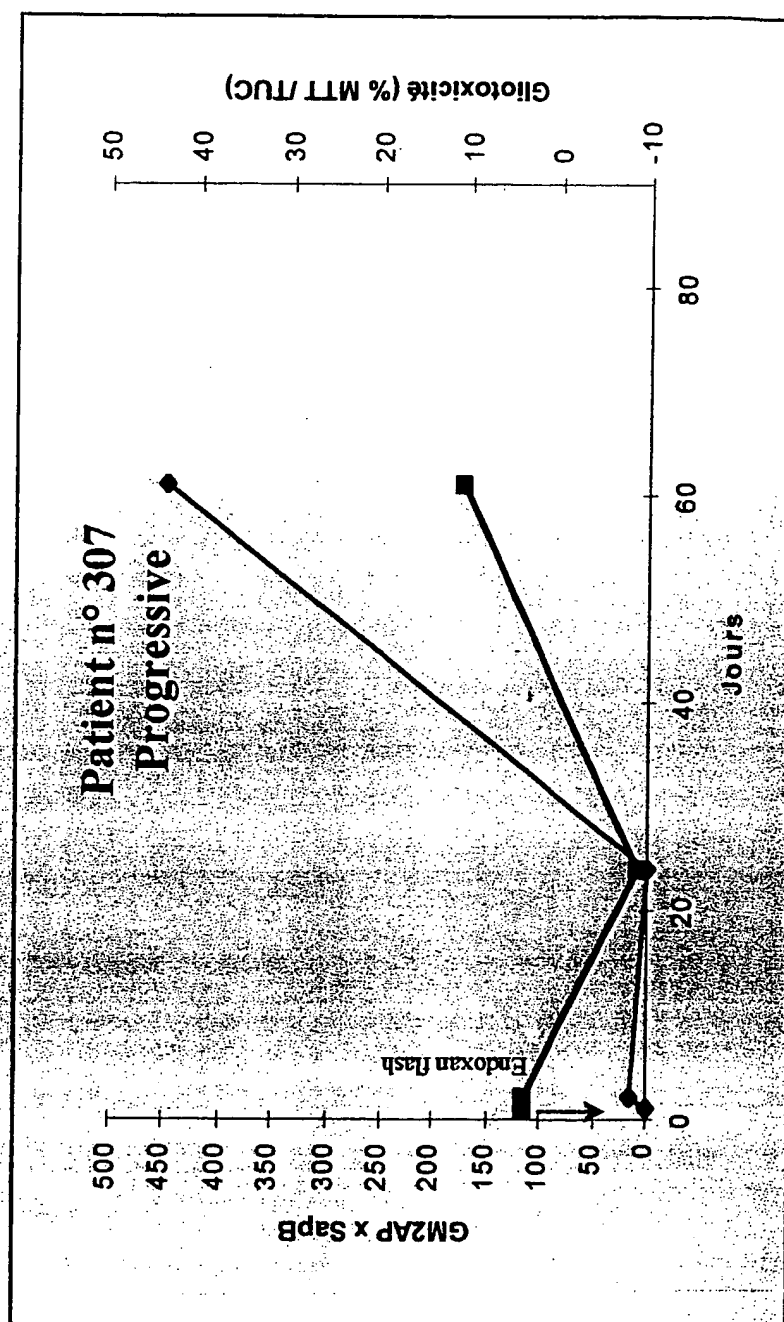
GM2AP & Gliotoxici 

SapB & Gliotoxici 





14/18

**Figure 14**

15/18

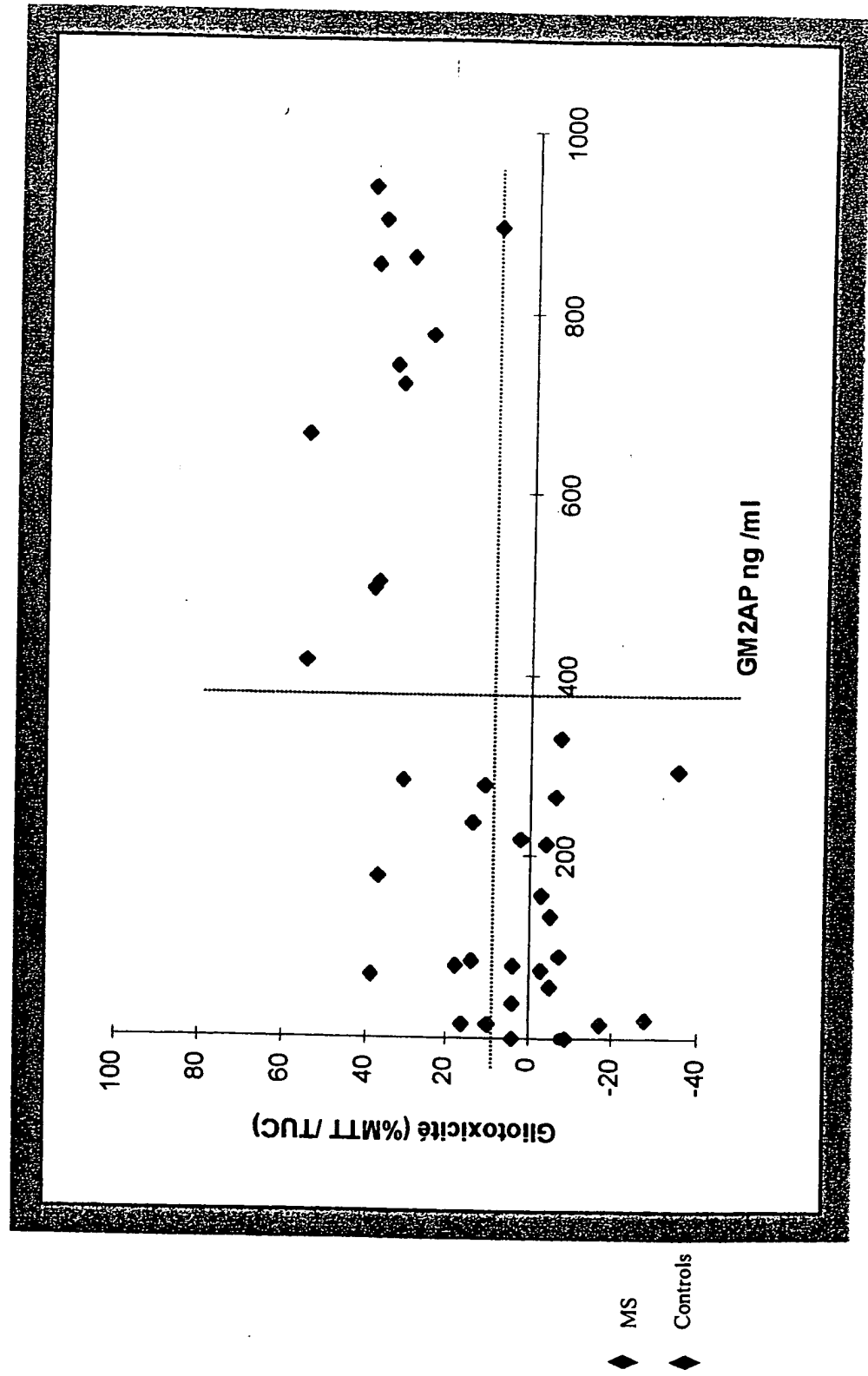
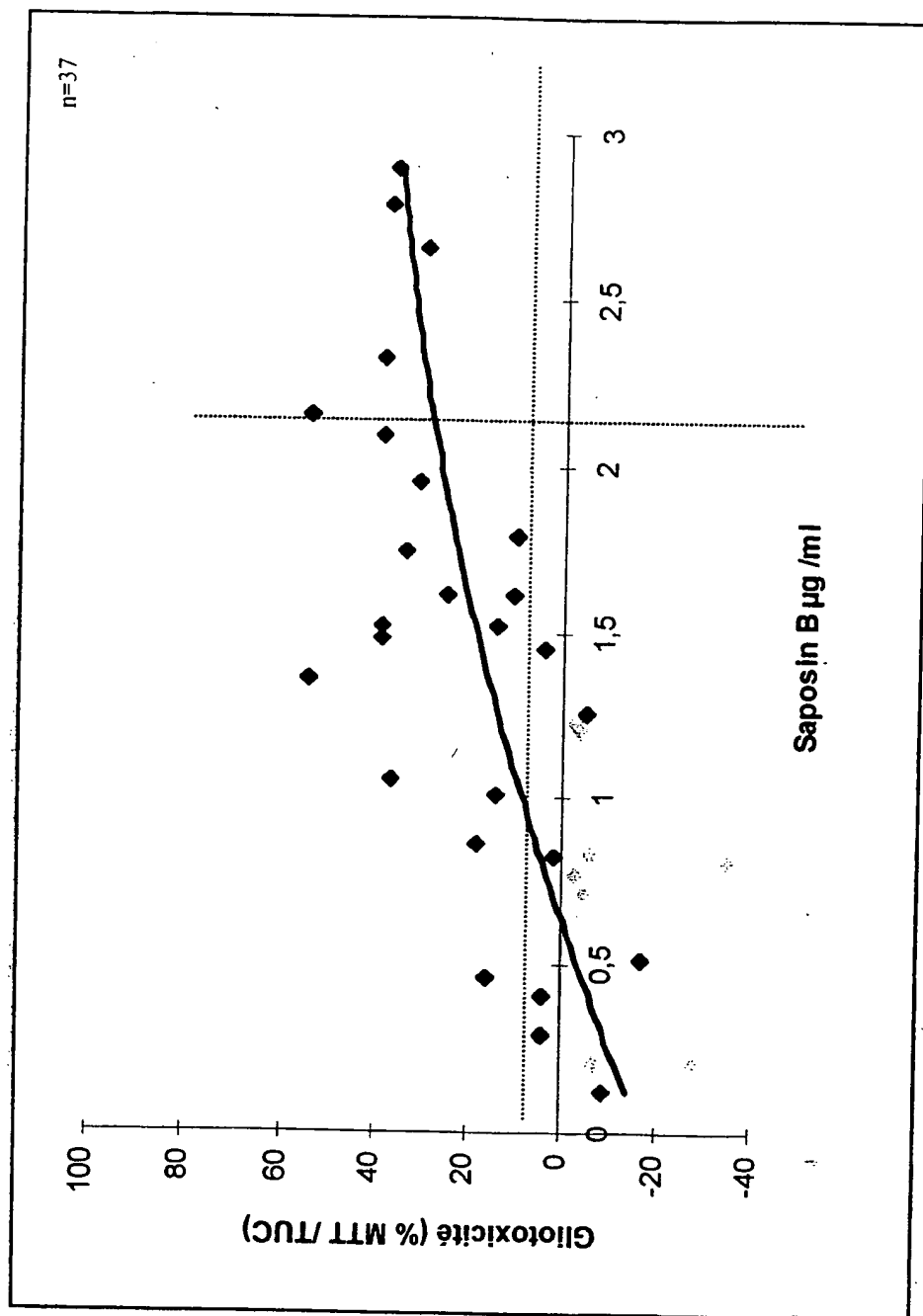
**Figure 15**

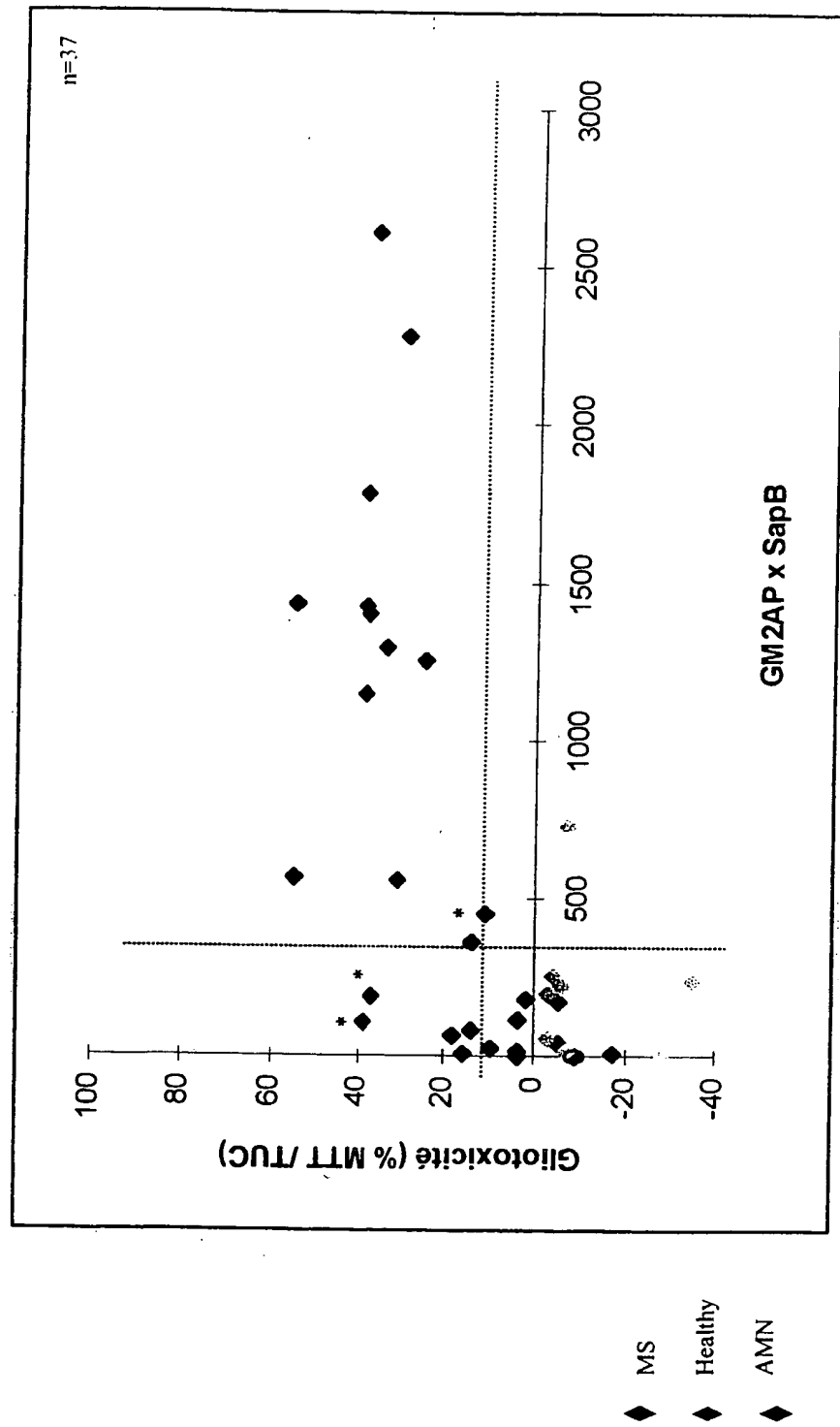
Figure 16



◆ MS  
 ◆ Healthy  
 ◆ AMN

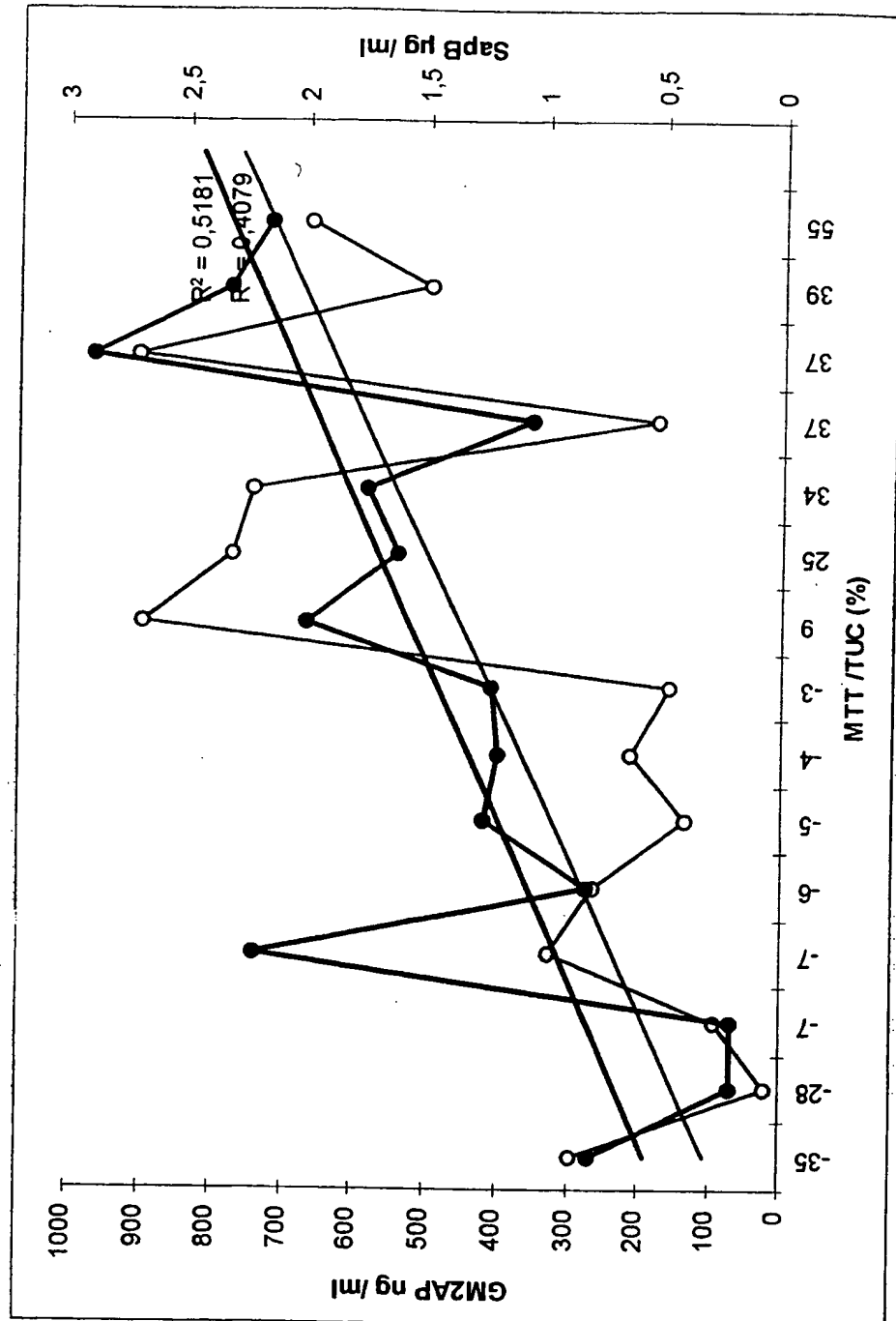
17/18

Figure 17



18/18

Figure 18



## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; BIOMERIEUX STELHYS

5 <120> Utilisation d'un polypeptide pour détecter, prévenir ou  
traiter un état pathologique associé à une maladie  
dégénérative, neurologique ou auto-immune

&lt;130&gt; SEP22

10

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; FR9909372

15

&lt;151&gt; 1999-07-15

&lt;160&gt; 75

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

20

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 4393

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

25

&lt;400&gt; 1

Met Gly Trp Arg Ala Pro Gly Ala Leu Leu Leu Ala Leu Leu His  
1 5 10 15

30 Gly Arg Leu Leu Ala Val Thr His Gly Leu Arg Ala Tyr Asp Gly Leu  
20 25 30

Ser Leu Pro Glu Asp Ile Glu Thr Val Thr Ala Ser Gln Met Arg Trp  
35 40 45

35

Thr His Ser Tyr Leu Ser Asp Asp Glu Asp Met Leu Ala Asp Ser Ile  
50 55 60

40 Ser Gly Asp Asp Leu Gly Ser Gly Asp Leu Gly Ser Gly Asp Phe Gln  
65 70 75 80

Met Val Tyr Phe Arg Ala Leu Val Asn Phe Thr Arg Ser Ile Glu Tyr  
85 90 95

45 Ser Pro Gln Leu Glu Asp Ala Gly Ser Arg Glu Phe Arg Glu Val Ser  
100 105 110

Glu Ala Val Val Asp Thr Leu Glu Ser Glu Tyr Leu Lys Ile Pro Gly  
115 120 125

50

Asp Gln Val Val Ser Val Val Phe Ile Lys Glu Leu Asp Gly Trp Val  
130 135 140

55 Phe Val Glu Leu Asp Val Gly Ser Glu Gly Asn Ala Asp Gly Ala Gln  
145 150 155 160

Ile Gln Glu Met Leu Leu Arg Val Ile Ser Ser Gly Ser Val Ala Ser  
165 170 175

Tyr Val Thr Ser Pro Gln Gly Phe Gln Phe Arg Arg Leu Gly Thr Val  
 180 185 190  
 5 Pro Gln Phe Pro Arg Ala Cys Thr Glu Ala Glu Phe Ala Cys His Ser  
 195 200 205  
 Tyr Asn Glu Cys Val Ala Leu Glu Tyr Arg Cys Asp Arg Arg Pro Asp  
 210 215 220  
 10 Cys Arg Asp Met Ser Asp Glu Leu Asn Cys Glu Glu Pro Val Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Ile Ser Pro Thr Phe Ser Leu Leu Val Glu Thr Thr Ser Leu Pro Pro  
 15 245 250 255  
 Arg Pro Glu Thr Thr Ile Met Arg Gln Pro Pro Val Thr His Ala Pro  
 260 265 270  
 20 Gln Pro Leu Leu Pro Gly Ser Val Arg Pro Leu Pro Cys Gly Pro Gln  
 275 280 285  
 Glu Ala Ala Cys Arg Asn Gly His Cys Ile Pro Arg Asp Tyr Leu Cys  
 290 295 300  
 25 Asp Gly Gln Glu Asp Cys Glu Asp Gly Ser Asp Glu Leu Asp Cys Gly  
 305 310 315 320  
 Pro Pro Pro Pro Cys Glu Pro Asn Glu Phe Pro Cys Gly Asn Gly His  
 30 325 330 335  
 Cys Ala Leu Lys Leu Trp Arg Cys Asp Gly Asp Phe Asp Cys Glu Asp  
 340 345 350  
 35 Arg Thr Asp Glu Ala Asn Cys Pro Thr Lys Arg Pro Glu Glu Val Cys  
 355 360 365  
 Gly Pro Thr Gln Phe Arg Cys Val Ser Thr Asn Met Cys Ile Pro Ala  
 370 375 380  
 40 Ser Phe His Cys Asp Glu Glu Ser Asp Cys Pro Asp Arg Ser Asp Glu  
 385 390 395 400  
 Phe Gly Cys Met Pro Pro Gln Val Val Thr Pro Pro Arg Glu Ser Ile  
 45 405 410 415  
 Gln Ala Ser Arg Gly Gln Thr Val Thr Phe Thr Cys Val Ala Ile Gly  
 420 425 430  
 50 Val Pro Ala Pro Phe Leu Ile Asn Trp Arg Leu Asn Trp Gly His Ile  
 435 440 445  
 Pro Ser Gln Pro Arg Val Thr Val Thr Ser Glu Gly Gly Arg Gly Thr  
 450 455 460  
 55 Leu Ile Ile Arg Asp Val Lys Glu Ser Asp Gln Gly Ala Tyr Thr Cys  
 465 470 475 480

Glu Ala Met Asn Ala Arg Gly Met Val Phe Gly Ile Pro Asp Gly Val  
 485 490 495  
 5 Leu Glu Leu Val Pro Gln Arg Ala Gly Pro Cys Pro Asp Gly His Phe  
 500 505 510  
 Tyr Leu Glu His Ser Ala Ala Cys Leu Pro Cys Phe Cys Phe Gly Ile  
 515 520 525  
 10 Thr Ser Val Cys Gln Ser Thr Arg Arg Phe Arg Asp Gln Ile Arg Leu  
 530 535 540  
 Arg Phe Asp Gln Pro Asp Asp Phe Lys Gly Val Asn Val Thr Met Pro  
 545 550 555 560  
 15 Ala Gln Pro Gly Thr Pro Pro Leu Ser Ser Thr Gln Leu Gln Ile Asp  
 565 570 575  
 Pro Ser Leu His Glu Phe Gln Leu Val Asp Leu Ser Arg Arg Phe Leu  
 580 585 590  
 Val His Asp Ser Phe Trp Ala Leu Pro Glu Gln Phe Leu Gly Asn Lys  
 595 600 605  
 25 Val Asp Ser Tyr Gly Gly Ser Leu Arg Tyr Asn Val Arg Tyr Glu Leu  
 610 615 620  
 Ala Arg Gly Met Leu Glu Pro Val Gln Arg Pro Asp Val Val Leu Val  
 625 630 635 640  
 30 Gly Ala Gly Tyr Arg Leu Leu Ser Arg Gly His Thr Pro Thr Gln Pro  
 645 650 655  
 Gly Ala Leu Asn Gln Arg Gln Val Gln Phe Ser Glu Glu His Trp Val  
 660 665 670  
 His Glu Ser Gly Arg Pro Val Gln Arg Ala Glu Leu Leu Gln Val Leu  
 675 680 685  
 40 Gln Ser Leu Glu Ala Val Leu Ile Gln Thr Val Tyr Asn Thr Lys Met  
 690 695 700  
 Ala Ser Val Gly Leu Ser Asp Ile Ala Met Asp Thr Thr Val Thr His  
 705 710 715 720  
 45 Ala Thr Ser His Gly Arg Ala His Ser Val Glu Glu Cys Arg Cys Pro  
 725 730 735  
 Ile Gly Tyr Ser Gly Leu Ser Cys Glu Ser Cys Asp Ala His Phe Thr  
 740 745 750  
 Arg Val Pro Gly Gly Pro Tyr Leu Gly Thr Cys Ser Gly Cys Ser Cys  
 755 760 765  
 55 Asn Gly His Ala Ser Ser Cys Asp Pro Val Tyr Gly His Cys Leu Asn  
 770 775 780  
 Cys Gln His Asn Thr Glu Gly Pro Gln Cys Lys Lys Cys Lys Ala Gly



785                      790                      795                      800  
 Phe Phe Gly Asp Ala Met Lys Ala Thr Ala Thr Ser Cys Arg Pro Cys  
                                  805                      810                      815  
 5    Pro Cys Pro Tyr Ile Asp Ala Ser Arg Arg Phe Ser Asp Thr Cys Phe  
                                  820                      825                      830  
 10    Leu Asp Thr Asp Gly Gln Ala Thr Cys Asp Ala Cys Ala Pro Gly Tyr  
                                  835                      840                      845  
   Thr Gly Arg Arg Cys Glu Ser Cys Ala Pro Gly Tyr Glu Gly Asn Pro  
                                  850                      855                      860  
 15    Ile Gln Pro Gly Gly Lys Cys Arg Pro Val Asn Gln Glu Ile Val Arg  
                                  865                      870                      875                      880  
   Cys Asp Glu Arg Gly Ser Met Gly Thr Ser Gly Glu Ala Cys Arg Cys  
                                  885                      890                      895  
 20    Lys Asn Asn Val Val Gly Arg Leu Cys Asn Glu Cys Ala Asp Arg Ser  
                                  900                      905                      910  
 25    Phe His Leu Ser Thr Arg Asn Pro Asp Gly Cys Leu Lys Cys Phe Cys  
                                  915                      920                      925  
   Met Gly Val Ser Arg His Cys Thr Ser Ser Ser Trp Ser Arg Ala Gln  
                                  930                      935                      940  
 30    Leu His Gly Ala Ser Glu Glu Pro Gly His Phe Ser Leu Thr Asn Ala  
                                  945                      950                      955                      960  
   Ala Ser Thr His Thr Thr Asn Glu Gly Ile Phe Ser Pro Thr Pro Gly  
                                  965                      970                      975  
 35    Glu Leu Gly Phe Ser Ser Phe His Arg Leu Leu Ser Gly Pro Tyr Phe  
                                  980                      985                      990  
 40    Trp Ser Leu Pro Ser Arg Phe Leu Gly Asp Lys Val Thr Ser Tyr Gly  
                                  995                      1000                      1005  
   Gly Glu Leu Arg Phe Thr Val Thr Gln Arg Ser Gln Pro Gly Ser Thr  
                                  1010                      1015                      1020  
 45    Pro Leu His Gly Gln Pro Leu Val Val Leu Gln Gly Asn Asn Ile Ile  
                                  1025                      1030                      1035                      1040  
   Leu Glu His His Val Ala Gln Glu Pro Ser Pro Gly Gln Pro Ser Thr  
                                  1045                      1050                      1055  
 50    Phe Ile Val Pro Phe Arg Glu Gln Ala Trp Gln Arg Pro Asp Gly Gln  
                                  1060                      1065                      1070  
 55    Pro Ala Thr Arg Glu His Leu Leu Met Ala Leu Ala Gly Ile Asp Thr  
                                  1075                      1080                      1085  
   Leu Leu Ile Arg Ala Ser Tyr Ala Gln Gln Pro Ala Glu Ser Arg Val  
                                  1090                      1095                      1100

Ser Gly Ile Ser Met Asp Val Ala Val Pro Glu Glu Thr Gly Gln Asp  
 1105 1110 1115 1120

5 Pro Ala Leu Glu Val Glu Gln Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Arg Gly  
 1125 1130 1135

Pro Ser Cys Gln Asp Cys Asp Thr Gly Tyr Thr Arg Thr Pro Ser Gly  
 1140 1145 1150

10 Leu Tyr Leu Gly Thr Cys Glu Arg Cys Ser Cys His Gly His Ser Glu  
 1155 1160 1165

15 Ala Cys Glu Pro Glu Thr Gly Ala Cys Gln Gly Cys Gln His His Thr  
 1170 1175 1180

Glu Gly Pro Arg Cys Glu Gln Cys Gln Pro Gly Tyr Tyr Gly Asp Ala  
 1185 1190 1195 1200

20 Gln Arg Gly Thr Pro Gln Asp Cys Gln Leu Cys Pro Cys Tyr Gly Asp  
 1205 1210 1215

Pro Ala Ala Gly Gln Ala Ala His Thr Cys Phe Leu Asp Thr Asp Gly  
 1220 1225 1230

25 His Pro Thr Cys Asp Ala Cys Ser Pro Gly His Ser Gly Arg His Cys  
 1235 1240 1245

30 Glu Arg Cys Ala Pro Gly Tyr Tyr Gly Asn Pro Ser Gln Gly Gln Pro  
 1250 1255 1260

Cys Gln Arg Asp Ser Gln Val Pro Gly Pro Ile Gly Cys Asn Cys Asp  
 1265 1270 1275 1280

35 Pro Gln Gly Ser Val Ser Ser Gln Cys Asp Ala Ala Gly Gln Cys Gln  
 1285 1290 1295

Cys Lys Ala Gln Val Glu Gly Leu Thr Cys Ser His Cys Arg Pro His  
 1300 1305 1310

40 His Phe His Leu Ser Ala Ser Asn Pro Asp Gly Cys Leu Pro Cys Phe  
 1315 1320 1325

45 Cys Met Gly Ile Thr Gln Gln Cys Ala Ser Ser Ala Tyr Thr Arg His  
 1330 1335 1340

Leu Ile Ser Thr His Phe Ala Pro Gly Asp Phe Gln Gly Phe Ala Leu  
 1345 1350 1355 1360

50 Val Asn Pro Gln Arg Asn Ser Arg Leu Thr Gly Glu Phe Thr Val Glu  
 1365 1370 1375

Pro Val Pro Glu Gly Ala Gln Leu Ser Phe Gly Asn Phe Ala Gln Leu  
 1380 1385 1390

55 Gly His Glu Ser Phe Tyr Trp Gln Leu Pro Glu Thr Tyr Gln Gly Asp  
 1395 1400 1405

Lys Val Ala Ala Tyr Gly Gly Lys Leu Arg Tyr Thr Leu Ser Tyr Thr  
 1410 1415 1420  
 Ala Gly Pro Gln Gly Ser Pro Leu Ser Asp Pro Asp Val Gln Ile Thr  
 5 1425 1430 1435 1440  
 Gly Asn Asn Ile Met Leu Val Ala Ser Gln Pro Ala Leu Gln Gly Pro  
 1445 1450 1455  
 10 Glu Arg Arg Ser Tyr Glu Ile Met Phe Arg Glu Glu Phe Trp Arg Arg  
 1460 1465 1470  
 Pro Asp Gly Gln Pro Ala Thr Arg Glu His Leu Leu Met Ala Leu Ala  
 1475 1480 1485  
 15 Asp Leu Asp Glu Leu Leu Ile Arg Ala Thr Phe Ser Ser Val Pro Leu  
 1490 1495 1500  
 Val Ala Ser Ile Ser Ala Val Ser Leu Glu Val Ala Gln Pro Gly Pro  
 20 1505 1510 1515 1520  
 Ser Asn Arg Pro Arg Ala Leu Glu Val Glu Glu Cys Arg Cys Pro Pro  
 1525 1530 1535  
 25 Gly Tyr Ile Gly Leu Ser Cys Gln Asp Cys Ala Pro Gly Tyr Thr Arg  
 1540 1545 1550  
 Thr Gly Ser Gly Leu Tyr Leu Gly His Cys Glu Leu Cys Glu Cys Asn  
 1555 1560 1565  
 30 Gly His Ser Asp Leu Cys His Pro Glu Thr Gly Ala Cys Ser Gln Cys  
 1570 1575 1580  
 Gln His Asn Ala Ala Gly Glu Phe Cys Glu Leu Cys Ala Pro Gly Tyr  
 35 1585 1590 1595 1600  
 Tyr Gly Asp Ala Thr Ala Gly Thr Pro Glu Asp Cys Gln Pro Cys Ala  
 1605 1610 1615  
 40 Cys Pro Leu Thr Asn Pro Glu Asn Met Phe Ser Arg Thr Cys Glu Ser  
 1620 1625 1630  
 Leu Gly Ala Gly Gly Tyr Arg Cys Thr Ala Cys Glu Pro Gly Tyr Thr  
 1635 1640 1645  
 45 Gly Gln Tyr Cys Glu Gln Cys Gly Pro Gly Tyr Val Gly Asn Pro Ser  
 1650 1655 1660  
 Val Gln Gly Gly Gln Cys Leu Pro Glu Thr Asn Gln Ala Pro Leu Val  
 50 1665 1670 1675 1680  
 Val Glu Val His Pro Ala Arg Ser Ile Val Pro Gln Gly Gly Ser His  
 1685 1690 1695  
 55 Ser Leu Arg Cys Gln Val Ser Gly Arg Gly Pro His Tyr Phe Tyr Trp  
 1700 1705 1710  
 Ser Arg Glu Asp Gly Arg Pro Val Pro Ser Gly Thr Gln Gln Arg His

|    | 1715  | 1720      | 1725      |
|----|---|-----------|-----------|
|    | Gln Gly Ser Glu Leu His Phe Pro Ser Val Gln Pro Ser Asp Ala Gly |           |           |
|    | 1730  | 1735      | 1740      |
| 5  | Val Tyr Ile Cys Thr Cys Arg Asn Leu His Arg Ser Asn Thr Ser Arg |           |           |
|    | 1745  | 1750      | 1755 1760 |
|    | Ala Glu Leu Leu Val Thr Glu Ala Pro Ser Lys Pro Ile Thr Val Thr |           |           |
| 10 |   | 1765      | 1770 1775 |
|    | Val Glu Glu Gln Arg Ser Gln Ser Val Arg Pro Gly Ala Asp Val Thr |           |           |
|    | 1780  | 1785      | 1790      |
| 15 | Phe Ile Cys Thr Ala Lys Ser Lys Ser Pro Ala Tyr Thr Leu Val Trp |           |           |
|    | 1795  | 1800      | 1805      |
|    | Thr Arg Leu His Asn Gly Lys Leu Pro Thr Arg Ala Met Asp Phe Asn |           |           |
| 20 |   | 1810 1815 | 1820      |
|    | Gly Ile Leu Thr Ile Arg Asn Val Gln Leu Ser Asp Ala Gly Thr Tyr |           |           |
|    | 1825  | 1830      | 1835 1840 |
|    | Val Cys Thr Gly Ser Asn Met Phe Ala Met Asp Gln Gly Thr Ala Thr |           |           |
| 25 |   | 1845      | 1850 1855 |
|    | Leu His Val Gln Ala Ser Gly Thr Leu Ser Ala Pro Val Val Ser Ile |           |           |
|    | 1860  | 1865      | 1870      |
| 30 | His Pro Pro Gln Leu Thr Val Gln Pro Gly Gln Leu Ala Glu Phe Arg |           |           |
|    | 1875  | 1880      | 1885      |
|    | Cys Ser Ala Thr Gly Ser Pro Thr Pro Thr Leu Glu Trp Thr Gly Gly |           |           |
| 35 |   | 1890 1895 | 1900      |
|    | Pro Gly Gly Gln Leu Pro Ala Lys Ala Gln Ile His Gly Gly Ile Leu |           |           |
|    | 1905  | 1910      | 1915 1920 |
|    | Arg Leu Pro Ala Val Glu Pro Thr Asp Gln Ala Gln Tyr Leu Cys Arg |           |           |
| 40 |   | 1925      | 1930 1935 |
|    | Ala His Ser Ser Ala Gly Gln Gln Val Ala Arg Ala Val Leu His Val |           |           |
|    | 1940  | 1945      | 1950      |
| 45 | His Gly Gly Gly Gly Pro Arg Val Gln Val Ser Pro Glu Arg Thr Gln |           |           |
|    | 1955  | 1960      | 1965      |
|    | Val His Ala Gly Arg Thr Val Arg Leu Tyr Cys Arg Ala Ala Gly Val |           |           |
| 50 |   | 1970 1975 | 1980      |
|    | Pro Ser Ala Thr Ile Thr Trp Arg Lys Glu Gly Gly Ser Leu Pro Pro |           |           |
|    | 1985  | 1990      | 1995 2000 |
|    | Gln Ala Arg Ser Glu Arg Thr Asp Ile Ala Thr Leu Leu Ile Pro Ala |           |           |
| 55 |   | 2005      | 2010 2015 |
|    | Ile Thr Thr Ala Asp Ala Gly Phe Tyr Leu Cys Val Ala Thr Ser Pro |           |           |
|    | 2020  | 2025      | 2030      |

Ala Gly Thr Ala Gln Ala Arg Ile Gln Val Val Val Leu Ser Ala Ser  
2035 2040 2045

5 Asp Ala Ser Gln Pro Pro Val Lys Ile Glu Ser Ser Ser Pro Ser Val  
2050 2055 2060

Thr Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val Ala Gly Ser Ala  
2065 2070 2075 2080

10 His Ala Gln Val Thr Trp Tyr Arg Arg Gly Gly Ser Leu Pro His His  
2085 2090 2095

Thr Gln Val His Gly Ser Arg Leu Arg Leu Pro Gln Val Ser Pro Ala  
15 2100 2105 2110

Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Glu Asn Gly Ser Gly Pro Lys  
2115 2120 2125

20 Glu Ala Ser Ile Thr Val Ser Val Leu His Gly Thr His Ser Gly Pro  
2130 2135 2140

Ser Tyr Thr Pro Val Pro Gly Ser Thr Arg Pro Ile Arg Ile Glu Pro  
2145 2150 2155 2160

25 Ser Ser Ser His Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val  
2165 2170 2175

Val Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Gly  
30 2180 2185 2190

Ser Leu Pro Ala Arg His Gln Thr His Gly Ser Leu Leu Arg Leu His  
2195 2200 2205

35 Gln Val Thr Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys His Val Val Gly  
2210 2215 2220

Thr Ser Gly Pro Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Glu Ala Ser  
2225 2230 2235 2240

40 Val Ile Pro Gly Pro Ile Pro Pro Val Arg Ile Glu Ser Ser Ser Ser  
2245 2250 2255

Thr Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Ser Cys Val Val Ala Gly  
45 2260 2265 2270

Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp Tyr Lys Arg Gly Gly Ser Leu Pro  
2275 2280 2285

50 Ala Arg His Gln Val Arg Gly Ser Arg Leu Tyr Ile Phe Gln Ala Ser  
2290 2295 2300

Pro Ala Asp Ala Gly Gln Tyr Val Cys Arg Ala Ser Asn Gly Met Glu  
2305 2310 2315 2320

55 Ala Ser Ile Thr Val Thr Val Thr Gly Thr Gln Gly Ala Asn Leu Ala  
2325 2330 2335

Tyr Pro Ala Gly Ser Thr Gln Pro Ile Arg Ile Glu Pro Ser Ser Ser  
 2340 2345 2350  
 5 Gln Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val Pro Gly  
 2355 2360 2365  
 Gln Ser His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Gly Ser Leu Pro  
 2370 2375 2380  
 10 Val Arg His Gln Thr His Gly Ser Leu Leu Arg Leu Tyr Gln Ala Ser  
 2385 2390 2395 2400  
 Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Leu Gly Ser Ser Val  
 2405 2410 2415  
 15 Pro Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Glu Pro Ala Gly Ser Val  
 2420 2425 2430  
 Pro Ala Leu Gly Val Thr Pro Thr Val Arg Ile Glu Ser Ser Ser Ser  
 2435 2440 2445  
 Gln Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Leu Val Ala Gly  
 2450 2455 2460  
 25 Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Gly Ser Leu Pro  
 2465 2470 2475 2480  
 Ala Arg His Gln Val His Gly Ser Arg Leu Arg Leu Leu Gln Val Thr  
 2485 2490 2495  
 30 Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Val Gly Ser Ser Gly  
 2500 2505 2510  
 Thr Gln Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Gln Gln Arg Leu Ser Gly  
 2515 2520 2525  
 35 Ser His Ser Gln Gly Val Ala Tyr Pro Val Arg Ile Glu Ser Ser Ser  
 2530 2535 2540  
 Ala Ser Leu Ala Asn Gly His Thr Leu Asp Leu Asn Cys Leu Val Ala  
 2545 2550 2555 2560  
 Ser Gln Ala Pro His Thr Ile Thr Trp Tyr Lys Arg Gly Gly Ser Leu  
 2565 2570 2575  
 45 Pro Ser Arg His Gln Ile Val Gly Ser Arg Leu Arg Ile Pro Gln Val  
 2580 2585 2590  
 Thr Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys His Val Ser Asn Gly Ala  
 2595 2600 2605  
 50 Gly Ser Arg Glu Thr Ser Leu Ile Val Thr Ile Gln Gly Ser Gly Ser  
 2610 2615 2620  
 Ser His Val Pro Arg Val Ser Pro Pro Ile Arg Ile Glu Ser Ser Ser  
 2625 2630 2635 2640  
 Pro Thr Val Val Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val Ala

|    |   |      |      |
|----|---|------|------|
|    | 2645  | 2650 | 2655 |
|    | Arg Gln Pro Gln Ala Ile Ile Thr Trp Tyr Lys Arg Gly Gly Ser Leu |      |      |
|    | 2660  | 2665 | 2670 |
| 5  | Pro Ser Arg His Gln Thr His Gly Ser His Leu Arg Leu His Gln Met |      |      |
|    | 2675  | 2680 | 2685 |
| 10 | Ser Val Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Ala Asn Asn Ile     |      |      |
|    | 2690  | 2695 | 2700 |
|    | Asp Ala Leu Glu Ala Ser Ile Val Ile Ser Val Ser Pro Ser Ala Gly |      |      |
|    | 2705  | 2710 | 2715 |
| 15 | Ser Pro Ser Ala Pro Gly Ser Ser Met Pro Ile Arg Ile Glu Ser Ser |      |      |
|    | 2725  | 2730 | 2735 |
|    | Ser Ser His Val Ala Glu Gly Glu Thr Leu Asp Leu Asn Cys Val Val |      |      |
|    | 2740  | 2745 | 2750 |
| 20 | Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys Arg Gly Gly Ser |      |      |
|    | 2755  | 2760 | 2765 |
|    | Leu Pro Ser Tyr His Gln Thr Arg Gly Ser Arg Leu Arg Leu His His |      |      |
| 25 | 2770  | 2775 | 2780 |
|    | Val Ser Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val Cys Arg Val Met Gly Ser |      |      |
|    | 2785  | 2790 | 2795 |
| 30 | Ser Gly Pro Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile Glu Ala Ser Gly |      |      |
|    | 2805  | 2810 | 2815 |
|    | Ser Ser Ala Val His Val Pro Ala Pro Gly Gly Ala Pro Pro Ile Arg |      |      |
|    | 2820  | 2825 | 2830 |
| 35 | Ile Glu Pro Ser Ser Ser Arg Val Ala Glu Gly Gln Thr Leu Asp Leu |      |      |
|    | 2835  | 2840 | 2845 |
|    | Lys Cys Val Val Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp His Lys |      |      |
| 40 | 2850  | 2855 | 2860 |
|    | Arg Gly Gly Asn Leu Pro Ala Arg His Gln Val His Gly Pro Leu Leu |      |      |
|    | 2865  | 2870 | 2875 |
| 45 | Arg Leu Asn Gln Val Ser Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Ser Cys Gln |      |      |
|    | 2885  | 2890 | 2895 |
|    | Val Thr Gly Ser Ser Gly Thr Leu Glu Ala Ser Val Leu Val Thr Ile |      |      |
|    | 2900  | 2905 | 2910 |
| 50 | Glu Pro Ser Ser Pro Gly Pro Ile Pro Ala Pro Gly Leu Ala Gln Pro |      |      |
|    | 2915  | 2920 | 2925 |
|    | Ile Tyr Ile Glu Ala Ser Ser Ser His Val Thr Glu Gly Gln Thr Leu |      |      |
| 55 | 2930  | 2935 | 2940 |
|    | Asp Leu Asn Cys Val Val Pro Gly Gln Ala His Ala Gln Val Thr Trp |      |      |
|    | 2945  | 2950 | 2955 |
|    |   |      | 2960 |

Tyr Lys Arg Gly Gly Ser Leu Pro Ala Arg His Gln Thr His Gly Ser  
 2965 2970 2975  
 5 Gln Leu Arg Leu His His Val Ser Pro Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Val  
 2980 2985 2990  
 Cys Arg Ala Ala Gly Gly Pro Gly Pro Glu Gln Glu Ala Ser Phe Thr  
 2995 3000 3005  
 10 Val Thr Val Pro Pro Ser Glu Gly Ser Ser Tyr Arg Leu Arg Ser Pro  
 3010 3015 3020  
 Val Ile Ser Ile Asp Pro Pro Ser Ser Thr Val Gln Gln Gly Gln Asp  
 15 3025 3030 3035 3040  
 Ala Ser Phe Lys Cys Leu Ile His Asp Gly Ala Ala Pro Ile Ser Leu  
 3045 3050 3055  
 20 Glu Trp Lys Thr Arg Asn Gln Glu Leu Glu Asp Asn Val His Ile Ser  
 3060 3065 3070  
 Pro Asn Gly Ser Ile Ile Thr Ile Val Gly Thr Arg Pro Ser Asn His  
 3075 3080 3085  
 25 Gly Thr Tyr Arg Cys Val Ala Ser Asn Ala Tyr Gly Val Ala Gln Ser  
 3090 3095 3100  
 Val Val Asn Leu Ser Val His Gly Pro Pro Thr Val Ser Val Leu Pro  
 30 3105 3110 3115 3120  
 Glu Gly Pro Val Trp Val Lys Val Gly Lys Ala Val Thr Leu Glu Cys  
 3125 3130 3135  
 35 Val Ser Ala Gly Glu Pro Arg Ser Ser Ala Arg Trp Thr Arg Ile Ser  
 3140 3145 3150  
 Ser Thr Pro Ala Lys Leu Glu Gln Arg Thr Tyr Gly Leu Met Asp Ser  
 3155 3160 3165  
 40 His Thr Val Leu Gln Ile Ser Ser Ala Lys Pro Ser Asp Ala Gly Thr  
 3170 3175 3180  
 Tyr Val Cys Leu Ala Gln Asn Ala Leu Gly Thr Ala Gln Lys Gln Val  
 45 3185 3190 3195 3200  
 Glu Val Ile Val Asp Thr Gly Ala Met Ala Pro Gly Ala Pro Gln Val  
 3205 3210 3215  
 50 Gln Ala Glu Glu Ala Glu Leu Thr Val Glu Ala Gly His Thr Ala Thr  
 3220 3225 3230  
 Leu Arg Cys Ser Ala Thr Gly Ser Pro Ala Arg Thr Ile His Trp Ser  
 3235 3240 3245  
 55 Lys Leu Arg Ser Pro Leu Pro Trp Gln His Arg Leu Glu Gly Asp Thr  
 3250 3255 3260



Leu Ile Ile Pro Arg Val Ala Gln Gln Asp Ser Gly Gln Tyr Ile Cys  
 3265 3270 3275 3280  
 5 Asn Ala Thr Ser Pro Ala Gly His Ala Glu Ala Thr Ile Ile Leu His  
 3285 3290 3295  
 Val Glu Ser Pro Pro Tyr Ala Thr Thr Val Pro Glu His Ala Ser Val  
 3300 3305 3310  
 10 Gln Ala Gly Glu Thr Val Gln Leu Gln Cys Leu Ala His Gly Thr Pro  
 3315 3320 3325  
 Pro Leu Thr Phe Gln Trp Ser Arg Val Gly Ser Ser Leu Pro Gly Arg  
 3330 3335 3340  
 15 Ala Thr Ala Arg Asn Glu Leu Leu His Phe Glu Arg Ala Ala Pro Glu  
 3345 3350 3355 3360  
 20 Asp Ser Gly Arg Tyr Arg Cys Arg Val Thr Asn Lys Val Gly Ser Ala  
 3365 3370 3375  
 Glu Ala Phe Ala Gln Leu Leu Val Gln Gly Pro Pro Gly Ser Leu Pro  
 3380 3385 3390  
 25 Ala Thr Ser Ile Pro Ala Gly Ser Thr Pro Thr Val Gln Val Thr Pro  
 3395 3400 3405  
 Gln Leu Glu Thr Lys Ser Ile Gly Ala Ser Val Glu Phe His Cys Ala  
 3410 3415 3420  
 30 Val Pro Ser Asp Arg Gly Thr Gln Leu Arg Trp Phe Lys Glu Gly Gly  
 3425 3430 3435 3440  
 Gln Leu Pro Pro Gly His Ser Val Gln Asp Gly Val Leu Arg Ile Gln  
 3445 3450 3455  
 35 Asn Leu Asp Gln Ser Cys Gln Gly Thr Tyr Ile Cys Gln Ala His Gly  
 3460 3465 3470  
 40 Pro Trp Gly Lys Ala Gln Ala Ser Ala Gln Leu Val Ile Gln Ala Leu  
 3475 3480 3485  
 Pro Ser Val Leu Ile Asn Ile Arg Thr Ser Val Gln Thr Val Val Val  
 3490 3495 3500  
 45 Gly His Ala Val Glu Phe Glu Cys Leu Ala Leu Gly Asp Pro Lys Pro  
 3505 3510 3515 3520  
 50 Gln Val Thr Trp Ser Lys Val Gly Gly His Leu Arg Pro Gly Ile Val  
 3525 3530 3535  
 Gln Ser Gly Gly Val Val Arg Ile Ala His Val Glu Leu Ala Asp Ala  
 3540 3545 3550  
 55 Gly Gln Tyr Arg Cys Thr Ala Thr Asn Ala Ala Gly Thr Thr Gln Ser  
 3555 3560 3565  
 His Val Leu Leu Leu Val Gln Ala Leu Pro Gln Ile Ser Met Pro Gln

3570                      3575                      3580  
 Glu Val Arg Val Pro Ala Gly Ser Ala Ala Val Phe Pro Cys Ile Ala  
 3585                      3590                      3595                      3600  
 5 Ser Gly Tyr Pro Thr Pro Asp Ile Ser Trp Ser Lys Leu Asp Gly Ser  
                                  3605                      3610                      3615  
 10 Leu Pro Pro Asp Ser Arg Leu Glu Asn Asn Met Leu Met Leu Pro Ser  
                                  3620                      3625                      3630  
 Val Gln Pro Gln Asp Ala Gly Thr Tyr Val Cys Thr Ala Thr Asn Arg  
                                  3635                      3640                      3645  
 15 Gln Gly Lys Val Lys Ala Phe Ala His Leu Gln Val Pro Glu Arg Val  
                                  3650                      3655                      3660  
 Val Pro Tyr Phe Thr Gln Thr Pro Tyr Ser Phe Leu Pro Leu Pro Thr  
 20 3665                      3670                      3675                      3680  
 Ile Lys Asp Ala Tyr Arg Lys Phe Glu Ile Lys Ile Thr Phe Arg Pro  
                                  3685                      3690                      3695  
 25 Asp Ser Ala Asp Gly Met Leu Leu Tyr Asn Gly Gln Lys Arg Val Pro  
                                  3700                      3705                      3710  
 Gly Ser Pro Thr Asn Leu Ala Asn Arg Gln Pro Asp Phe Ile Ser Phe  
                                  3715                      3720                      3725  
 30 Gly Leu Val Gly Gly Arg Pro Glu Phe Arg Phe Asp Ala Gly Ser Gly  
                                  3730                      3735                      3740  
 Met Ala Thr Ile Arg His Pro Thr Pro Leu Ala Leu Gly His Phe His  
 35 3745                      3750                      3755                      3760  
 Thr Val Thr Leu Leu Arg Ser Leu Thr Gln Gly Ser Leu Ile Val Gly  
                                  3765                      3770                      3775  
 40 Asp Leu Ala Pro Val Asn Gly Thr Ser Gln Gly Lys Phe Gln Gly Leu  
                                  3780                      3785                      3790  
 Asp Leu Asn Glu Glu Leu Tyr Leu Gly Gly Tyr Pro Asp Tyr Gly Ala  
                                  3795                      3800                      3805  
 45 Ile Pro Lys Ala Gly Leu Ser Ser Gly Phe Ile Gly Cys Val Arg Glu  
                                  3810                      3815                      3820  
 Leu Arg Ile Gln Gly Glu Glu Ile Val Phe His Asp Leu Asn Leu Thr  
 50 3825                      3830                      3835                      3840  
 Ala His Gly Ile Ser His Cys Pro Thr Cys Arg Asp Arg Pro Cys Gln  
                                  3845                      3850                      3855  
 55 Asn Gly Gly Gln Cys His Asp Ser Glu Ser Ser Ser Tyr Val Cys Val  
                                  3860                      3865                      3870  
 Cys Pro Ala Gly Phe Thr Gly Ser Arg Cys Glu His Ser Gln Ala Leu  
                                  3875                      3880                      3885

His Cys His Pro Glu Ala Cys Gly Pro Asp Ala Thr Cys Val Asn Arg  
 3890 3895 3900

5 Pro Asp Gly Arg Gly Tyr Thr Cys Arg Cys His Leu Gly Arg Ser Gly  
 3905 3910 3915 3920

Leu Arg Cys Glu Glu Gly Val Thr Val Thr Thr Pro Ser Leu Ser Gly  
 3925 3930 3935

10 Ala Gly Ser Tyr Leu Ala Leu Pro Ala Leu Thr Asn Thr His His Glu  
 3940 3945 3950

Leu Arg Leu Asp Val Glu Phe Lys Pro Leu Ala Pro Asp Gly Val Leu  
 15 3955 3960 3965

Leu Phe Ser Gly Gly Lys Ser Gly Pro Val Glu Asp Phe Val Ser Leu  
 3970 3975 3980

20 Ala Met Val Gly Gly His Leu Glu Phe Arg Tyr Glu Leu Gly Ser Gly  
 3985 3990 3995 4000

Leu Ala Val Leu Arg Thr Ala Glu Pro Leu Ala Leu Gly Arg Trp His  
 4005 4010 4015

25 Arg Val Ser Ala Glu Arg Leu Asn Lys Asp Gly Ser Leu Arg Val Asn  
 4020 4025 4030

Gly Gly Arg Pro Val Leu Arg Ser Ser Pro Gly Lys Ser Gln Gly Leu  
 30 4035 4040 4045

Asn Leu His Thr Leu Leu Tyr Leu Gly Gly Val Glu Pro Ser Val Pro  
 4050 4055 4060

35 Leu Ser Pro Ala Thr Asn Met Ser Ala His Phe Arg Gly Cys Val Gly  
 4065 4070 4075 4080

Glu Val Ser Val Asn Gly Lys Arg Leu Asp Leu Thr Tyr Ser Phe Leu  
 4085 4090 4095

40 Gly Ser Gln Gly Ile Gly Gln Cys Tyr Asp Ser Ser Pro Cys Glu Arg  
 4100 4105 4110

Gln Pro Cys Gln His Gly Ala Thr Cys Met Pro Ala Gly Glu Tyr Glu  
 45 4115 4120 4125

Phe Gln Cys Leu Cys Arg Asp Gly Ile Lys Gly Asp Leu Cys Glu His  
 4130 4135 4140

50 Glu Glu Asn Pro Cys Gln Leu Arg Glu Pro Cys Leu His Gly Gly Thr  
 4145 4150 4155 4160

Cys Gln Gly Thr Arg Cys Leu Cys Leu Pro Gly Phe Ser Gly Pro Arg  
 4165 4170 4175

55 Cys Gln Gln Gly Ser Gly His Gly Ile Ala Glu Ser Asp Trp His Leu  
 4180 4185 4190

Glu Gly Ser Gly Gly Asn Asp Ala Pro Gly Gln Tyr Gly Ala Tyr Phe  
 4195 4200 4205  
 5 His Asp Asp Gly Phe Leu Ala Phe Pro Gly His Val Phe Ser Arg Ser  
 4210 4215 4220  
 Leu Pro Glu Val Pro Glu Thr Ile Glu Leu Glu Val Arg Thr Ser Thr  
 4225 4230 4235 4240  
 10 Ala Ser Gly Leu Leu Leu Trp Gln Gly Val Glu Val Gly Glu Ala Gly  
 4245 4250 4255  
 Gln Gly Lys Asp Phe Ile Ser Leu Gly Leu Gln Asp Gly His Leu Val  
 4260 4265 4270  
 15 Phe Arg Tyr Gln Leu Gly Ser Gly Glu Ala Arg Leu Val Ser Glu Asp  
 4275 4280 4285  
 Pro Ile Asn Asp Gly Glu Trp His Arg Val Thr Ala Leu Arg Glu Gly  
 20 4290 4295 4300  
 Arg Arg Gly Ser Ile Gln Val Asp Gly Glu Glu Leu Val Ser Gly Arg  
 4305 4310 4315 4320  
 25 Ser Pro Gly Pro Asn Val Ala Val Asn Ala Lys Gly Ser Ile Tyr Ile  
 4325 4330 4335  
 Gly Gly Ala Pro Asp Val Ala Thr Leu Thr Gly Gly Arg Phe Ser Ser  
 30 4340 4345 4350  
 Gly Ile Thr Gly Cys Val Lys Asn Leu Val Leu His Ser Ala Arg Pro  
 4355 4360 4365  
 Gly Ala Pro Pro Pro Gln Pro Leu Asp Leu Gln His Arg Ala Gln Ala  
 35 4370 4375 4380  
 Gly Ala Asn Thr Arg Pro Cys Pro Ser  
 4385 4390  
 40  
 <210> 2  
 <211> 195  
 <212> PRT  
 45 <213> Homo sapiens  
 <400> 2  
 Asp Ala Pro Gly Gln Tyr Gly Ala Tyr Phe His Asp Asp Gly Phe Leu  
 1 5 10 15  
 50 Ala Phe Pro Gly His Val Phe Ser Arg Ser Leu Pro Glu Val Pro Glu  
 20 25 30  
 Thr Ile Glu Leu Glu Val Arg Thr Ser Thr Ala Ser Gly Leu Leu Leu  
 55 35 40 45  
 Trp Gln Gly Val Glu Val Gly Glu Ala Gly Gln Gly Lys Asp Phe Ile  
 50 55 60

Ser Leu Gly Leu Gln Asp Gly His Leu Val Phe Arg Tyr Gln Leu Gly  
 65 70 75 80  
 5 Ser Gly Glu Ala Arg Leu Val Ser Glu Asp Pro Ile Asn Asp Gly Glu  
 85 90 95  
 Trp His Arg Val Thr Ala Leu Arg Glu Gly Arg Arg Gly Ser Ile Gln  
 100 105 110  
 10 Val Asp Gly Glu Glu Leu Val Ser Gly Arg Ser Pro Gly Pro Asn Val  
 115 120 125  
 Ala Val Asn Ala Lys Gly Ser Val Tyr Ile Gly Gly Ala Pro Asp Val  
 130 135 140  
 15 Ala Thr Leu Thr Gly Gly Arg Phe Ser Ser Gly Ile Thr Gly Cys Val  
 145 150 155 160  
 20 Lys Asn Leu Val Leu His Ser Ala Arg Pro Gly Ala Pro Pro Pro Gln  
 165 170 175  
 Pro Leu Asp Leu Gln His Arg Ala Gln Ala Gly Ala Asn Thr Arg Pro  
 180 185 190  
 25 Cys Pro Ser  
 195  
 30  
 <210> 3  
 <211> 508  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 35  
 <400> 3  
 Arg Thr Cys Arg Cys Lys Asn Asn Val Val Gly Arg Leu Cys Asn Glu  
 1 5 10 15  
 40 Cys Ala Asp Arg Ser Phe His Leu Ser Thr Arg Asn Pro Asp Gly Cys  
 20 25 30  
 Leu Lys Cys Phe Cys Met Gly Val Ser Arg His Cys Thr Ser Ser Ser  
 35 40 45  
 45 Trp Ser Arg Ala Gln Leu His Gly Ala Ser Glu Glu Pro Gly His Phe  
 50 55 60  
 Ser Leu Thr Asn Ala Ala Ser Thr His Thr Thr Asn Glu Gly Ile Phe  
 65 70 75 80  
 Ser Pro Thr Pro Gly Glu Leu Gly Phe Ser Ser Phe His Arg Leu Leu  
 85 90 95  
 55 Ser Gly Pro Tyr Phe Trp Ser Leu Pro Ser Arg Phe Leu Gly Asp Lys  
 100 105 110  
 Val Thr Ser Tyr Gly Gly Glu Leu Arg Phe Thr Val Thr Gln Arg Ser

|    | 115                     | 120                 | 125                 |
|----|-------------------------|---------------------|---------------------|
|    | Gln Pro Gly Ser Thr Pro | Leu His Gly Gln Pro | Leu Val Val Leu Gln |
|    | 130                     | 135                 | 140                 |
| 5  | Gly Asn Asn Ile Ile Leu | Glu His His Val Ala | Gln Glu Pro Ser Pro |
|    | 145                     | 150                 | 155 160             |
| 10 | Gly Gln Pro Ser Thr Phe | Ile Val Pro Phe Arg | Glu Gln Ala Trp Gln |
|    | 165                     | 170                 | 175                 |
|    | Arg Pro Asp Gly Gln Pro | Ala Thr Arg Glu His | Leu Leu Met Ala Leu |
|    | 180                     | 185                 | 190                 |
| 15 | Ala Gly Ile Asp Thr Leu | Leu Ile Arg Ala Ser | Tyr Ala Gln Gln Pro |
|    | 195                     | 200                 | 205                 |
|    | Ala Glu Ser Arg Leu Ser | Gly Ile Ser Met Asp | Val Ala Val Pro Glu |
|    | 210                     | 215                 | 220                 |
| 20 | Glu Thr Gly Gln Asp Pro | Ala Leu Glu Val Glu | Gln Cys Ser Cys Pro |
|    | 225                     | 230                 | 235 240             |
| 25 | Pro Gly Tyr Leu Gly Pro | Ser Cys Gln Asp Cys | Asp Thr Gly Tyr Thr |
|    | 245                     | 250                 | 255                 |
|    | Arg Thr Pro Ser Gly Leu | Tyr Leu Gly Thr Cys | Glu Arg Cys Ser Cys |
|    | 260                     | 265                 | 270                 |
| 30 | His Gly His Ser Glu Ala | Cys Glu Pro Glu Thr | Gly Ala Cys Gln Gly |
|    | 275                     | 280                 | 285                 |
|    | Cys Gln His His Thr Glu | Gly Pro Arg Cys Glu | Gln Cys Gln Pro Gly |
|    | 290                     | 295                 | 300                 |
| 35 | Tyr Tyr Gly Asp Ala Gln | Arg Gly Thr Pro Gln | Asp Cys Gln Leu Cys |
|    | 305                     | 310                 | 315 320             |
| 40 | Pro Cys Tyr Gly Asp Pro | Ala Ala Gly Gln Ala | Ala Leu Thr Cys Phe |
|    | 325                     | 330                 | 335                 |
|    | Leu Asp Thr Asp Gly His | Pro Thr Cys Asp Ala | Cys Ser Pro Gly His |
|    | 340                     | 345                 | 350                 |
| 45 | Ser Gly Arg His Cys Glu | Arg Cys Ala Pro Gly | Tyr Tyr Gly Asn Pro |
|    | 355                     | 360                 | 365                 |
|    | Ser Gln Gly Gln Pro Cys | Gln Arg Asp Ser Gln | Val Pro Gly Pro Ile |
|    | 370                     | 375                 | 380                 |
| 50 | Gly Cys Asn Cys Asp Pro | Gln Gly Ser Val Ser | Ser Gln Cys Asp Ala |
|    | 385                     | 390                 | 395 400             |
| 55 | Ala Gly Gln Cys Gln Cys | Lys Ala Gln Val Glu | Gly Leu Thr Cys Ser |
|    | 405                     | 410                 | 415                 |
|    | His Cys Arg Pro His His | Phe His Leu Ser Ala | Ser Asn Pro Asp Gly |
|    | 420                     | 425                 | 430                 |

Cys Leu Pro Cys Phe Cys Met Gly Ile Thr Gln Gln Cys Ala Ser Ser  
 435 440 445  
 5 Ala Tyr Thr Arg His Leu Ile Ser Thr His Phe Ala Pro Gly Asp Phe  
 450 455 460  
 Gln Gly Phe Ala Leu Val Asn Pro Gln Arg Asn Ser Arg Leu Thr Gly  
 465 470 475 480  
 10 Glu Phe Thr Val Glu Pro Val Pro Glu Gly Ala Gln Leu Ser Phe Gly  
 485 490 495  
 Asn Phe Ala Gln Leu Gly His Glu Ser Phe Tyr Trp  
 15 500 505  
 <210> 4  
 20 <211> 199  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4  
 25 Met Lys Trp Val Trp Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Ala Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp  
 20 25 30  
 30 Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro  
 35 40 45  
 Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp  
 35 50 55 60  
 Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu  
 65 70 75 80  
 40 Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr  
 85 90 95  
 Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe  
 100 105 110  
 45 Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp  
 115 120 125  
 Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr  
 50 130 135 140  
 Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu  
 145 150 155 160  
 55 Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys  
 165 170 175  
 Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly

180 185 190

Arg Ser Glu Arg Asn Leu Leu  
195

5

<210> 5  
<211> 199  
10 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
Met Lys Trp Val Trp Ala Leu Leu Leu Ala Ala Trp Ala Ala Ala  
15 1 5 10 15

Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp  
20 25 30

20 Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro  
35 40 45

Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp  
25 50 55 60

Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu  
65 70 75 80

30 Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr  
85 90 95

Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe  
100 105 110

35 Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp  
115 120 125

Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr  
40 130 135 140

Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu  
145 150 155 160

45 Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys  
165 170 175

Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly  
180 185 190

50 Arg Ser Glu Arg Asn Leu Leu  
195

55 <210> 6  
<211> 199  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens



<400> 6  
 Met Lys Trp Val Trp Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Ala Ala Ala  
 1 5 10 15  
 5 Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp  
 20 25 30  
 10 Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro  
 35 40 45  
 Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp  
 50 55 60  
 15 Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu  
 65 70 75 80  
 Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr  
 85 90 95  
 20 Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe  
 100 105 110  
 25 Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp  
 115 120 125  
 Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr  
 130 135 140  
 30 Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu  
 145 150 155 160  
 Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys  
 165 170 175  
 35 Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly  
 180 185 190  
 40 Arg Ser Glu Arg Asn Leu Leu  
 195

<210> 7  
 45 <211> 182  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 7  
 50 Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn Phe Asp  
 1 5 10 15  
 Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys Asp Pro  
 20 25 30  
 55 Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser Val Asp  
 35 40 45

Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg Leu Leu  
           50                                  55                                  60

Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr Asp Thr  
 5       65                                  70                                  75                                  80

Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala Ser Phe  
                                   85                                  90                                  95

10   Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp Tyr Asp  
                                   100                                  105                                  110

Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp Gly Thr  
                                   115                                  120                                  125

15   Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn Gly Leu  
                                   130                                  135                                  140

20   Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu Leu Cys  
                                   145                                  150                                  155                                  160

Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys Asp Gly  
                                   165                                  170                                  175

25   Arg Ser Glu Arg Asn Leu  
                                   180

30   <210> 8  
       <211> 193  
       <212> PRT  
       <213> Homo sapiens

35   <400> 8  
       Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu  
           1                                  5                                  10                                  15

40   Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser  
                                   20                                  25                                  30

Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile  
                                   35                                  40                                  45

45   Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val  
                                   50                                  55                                  60

Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu  
   65                                  70                                  75                                  80

50   Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys  
                                   85                                  90                                  95

Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys  
 55       100                                  105                                  110

Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro  
                                   115                                  120                                  125

Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr  
 130 135 140

5 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro  
 145 150 155 160

Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser  
 165 170 175

10 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly  
 180 185 190

15 Ile

20 <210> 9  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

25 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10 15

Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser  
 20 25 30

30 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Phe Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile  
 35 40 45

35 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val  
 50 55 60

Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu  
 65 70 75 80

40 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys  
 85 90 95

Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys  
 100 105 110

45 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro  
 115 120 125

50 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr  
 130 135 140

Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Ala Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro  
 145 150 155 160

55 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser  
 165 170 175

Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly

180 185 190

Ile

5

<210> 10  
 <211> 178  
 10 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 10  
 15 Leu Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val  
 20 20 25 30  
 Ile Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn  
 25 35 40 45  
 Val Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro  
 50 55 60  
 25 Leu Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile  
 65 70 75 80  
 Lys Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe  
 30 85 90 95  
 Cys Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu  
 100 105 110  
 35 Pro Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly  
 115 120 125  
 Thr Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu  
 130 135 140  
 40 Pro Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser  
 145 150 155 160  
 Ser Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys  
 45 165 170 175  
 Gly Ile

50

<210> 11  
 <211> 200  
 <212> PRT  
 55 <213> Homo sapiens

<400> 11  
 Arg Ala Gly Pro Pro Phe Pro Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu



Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu Lys Val Asp Leu  
 65 70 75 80  
 Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys Ile Pro Cys Thr  
 5 85 90 95  
 Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys Asp Val Leu Asp  
 100 105 110  
 10 Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro Leu Arg Thr Tyr  
 115 120 125  
 Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr Tyr Ser Leu Pro  
 130 135 140  
 15 Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro Ser Trp Leu Thr  
 145 150 155 160  
 Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser Ser Gly Lys Arg  
 20 165 170 175  
 Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly Ile  
 180 185  
 25  
 <210> 13  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 30 <213> Homo sapiens  
 <400> 13  
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10 15  
 35 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser  
 20 25 30  
 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile  
 40 35 40 45  
 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val  
 50 55 60  
 45 Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys  
 85 90 95  
 50 Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys  
 100 105 110  
 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro  
 55 115 120 125  
 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr  
 130 135 140

Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro  
 145 150 155 160  
 5 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser  
 165 170 175  
 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly  
 180 185 190  
 10 Ile  
 15  
 <210> 14  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 20  
 <400> 14  
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10 15  
 25 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser  
 20 25 30  
 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile  
 35 40 45  
 30 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val  
 50 55 60  
 Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu  
 35 65 70 75 80  
 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys  
 85 90 95  
 40 Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys  
 100 105 110  
 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro  
 115 120 125  
 45 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr  
 130 135 140  
 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro  
 50 145 150 155 160  
 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser  
 165 170 175  
 55 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly  
 180 185 190  
 Ile

5 <210> 15  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 15  
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser  
 15 20 25 30  
 Ser Phe Ser Trp Asp Asn Cys Asp Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile  
 35 40 45  
 Arg Ser Leu Thr Leu Glu Pro Asp Pro Ile Val Val Pro Gly Asn Val  
 50 55 60  
 Thr Leu Ser Val Val Gly Ser Thr Ser Val Pro Leu Ser Ser Pro Leu  
 65 70 75 80  
 25 Lys Val Asp Leu Val Leu Glu Lys Glu Val Ala Gly Leu Trp Ile Lys  
 85 90 95  
 Ile Pro Cys Thr Asp Tyr Ile Gly Ser Cys Thr Phe Glu His Phe Cys  
 30 100 105 110  
 Asp Val Leu Asp Met Leu Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro  
 115 120 125  
 35 Leu Arg Thr Tyr Gly Leu Pro Cys His Cys Pro Phe Lys Glu Gly Thr  
 130 135 140  
 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Val Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro  
 145 150 155 160  
 40 Ser Trp Leu Thr Thr Gly Asn Tyr Arg Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser  
 165 170 175  
 Ser Gly Lys Arg Leu Gly Cys Ile Lys Ile Ala Ala Ser Leu Lys Gly  
 45 180 185 190  
 Ile

50  
 <210> 16  
 <211> 193  
 <212> PRT  
 55 <213> Homo sapiens

<400> 16  
 Met Gln Ser Leu Met Gln Ala Pro Leu Leu Ile Ala Leu Gly Leu Leu





Asp Leu Asp Thr Asn Ala Asp Lys Gln Leu Ser Phe Glu Glu Phe Ile  
 65 70 75 80  
 Met Leu Met Ala Arg Leu Thr Trp Ala Ser His Glu Lys Met His Glu  
 5 85 90 95  
 Gly Asp Glu Gly Pro Gly His His His Lys Pro Gly Leu Gly Glu Gly  
 100 105 110  
 10 Thr Pro  
 15 <210> 18  
 <211> 93  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 20 <400> 18  
 Met Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Ser Ile Ile Asp Val Tyr  
 1 5 10 15  
 His Lys Tyr Ser Leu Ile Lys Gly Asn Phe His Ala Val Tyr Arg Asp  
 25 20 25 30  
 Asp Leu Lys Lys Leu Leu Glu Thr Glu Cys Pro Gln Tyr Ile Arg Lys  
 35 40 45  
 30 Lys Gly Ala Asp Val Trp Phe Lys Glu Leu Asp Ile Asn Thr Asp Gly  
 50 55 60  
 Ala Val Asn Phe Gln Glu Phe Leu Ile Leu Val Ile Lys Met Gly Val  
 65 70 75 80  
 35 Ala Ala His Lys Lys Ser His Glu Glu Ser His Lys Glu  
 85 90  
 40 <210> 19  
 <211> 92  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 45 <400> 19  
 Met Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His  
 1 5 10 15  
 50 Gln Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu  
 20 25 30  
 Leu Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile  
 35 40 45  
 55 Lys Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn  
 50 55 60

Gln Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile  
 65 70 75 80

5 Ala Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu  
 85 90

10 <210> 20  
 <211> 92  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 20  
 Met Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His  
 1 5 10 15

20 Gln Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu  
 20 25 30

Leu Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile  
 35 40 45

25 Lys Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn  
 50 55 60

Gln Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile  
 65 70 75 80

30 Ala Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu  
 85 90

35 <210> 21  
 <211> 91  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

40 <400> 21  
 Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His Gln  
 1 5 10 15

45 Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu Leu  
 20 25 30

Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile Lys  
 35 40 45

50 Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn Gln  
 50 55 60

55 Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile Ala  
 65 70 75 80

Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu  
 85 90

<210> 22  
 <211> 93  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 22  
 Met Leu Thr Glu Leu Glu Lys Ala Leu Asn Ser Ile Ile Asp Val Tyr  
 10 1 5 10 15  
 His Lys Tyr Ser Leu Ile Lys Gly Asn Phe His Ala Val Tyr Arg Asp  
 20 25 30  
 15 Asp Leu Lys Lys Leu Leu Glu Thr Glu Cys Pro Gln Tyr Ile Arg Lys  
 35 40 45  
 Lys Gly Ala Asp Val Trp Phe Lys Glu Leu Asp Ile Asn Thr Asp Gly  
 50 55 60  
 20 Ala Val Asn Phe Gln Glu Phe Leu Ile Leu Val Ile Lys Met Gly Val  
 65 70 75 80  
 Ala Ala His Lys Lys Ser His Glu Glu Ser His Lys Glu  
 25 85 90

<210> 23  
 30 <211> 92  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 23  
 35 Met Thr Lys Leu Glu Glu His Leu Glu Gly Ile Val Asn Ile Phe His  
 1 5 10 15  
 Gln Tyr Ser Val Arg Lys Gly His Phe Asp Thr Leu Ser Lys Gly Glu  
 20 25 30  
 40 Leu Lys Gln Leu Leu Thr Lys Glu Leu Ala Asn Thr Ile Lys Asn Ile  
 35 40 45  
 Lys Asp Lys Ala Val Ile Asp Glu Ile Phe Gln Gly Leu Asp Ala Asn  
 45 50 55 60  
 Gln Asp Glu Gln Val Asp Phe Gln Glu Phe Ile Ser Leu Val Ala Ile  
 65 70 75 80  
 50 Ala Leu Lys Ala Ala His Tyr His Thr His Lys Glu  
 85 90

55 <210> 24  
 <211> 85  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 24  
 Asp Asn Gly Asp Val Cys Gln Asp Cys Ile Gln Met Val Thr Asp Ile  
 1 5 10 15  
 5 Gln Thr Ala Val Arg Thr Asn Ser Thr Phe Val Gln Ala Leu Val Glu  
 20 25 30  
 10 His Val Lys Glu Glu Cys Asp Arg Leu Gly Pro Gly Met Ala Asp Ile  
 35 40 45  
 Cys Lys Asn Tyr Ile Ser Gln Tyr Ser Glu Ile Ala Ile Gln Met Met  
 50 55 60  
 15 Met His Met Gln Asp Gln Gln Pro Lys Glu Ile Cys Ala Leu Val Gly  
 65 70 75 80  
 Phe Cys Asp Glu Val  
 85  
 20  
 <210> 25  
 <211> 381  
 25 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 25  
 Met Ala Glu Ser His Leu Leu Gln Trp Leu Leu Leu Leu Leu Pro Thr  
 1 5 10 15  
 30 Leu Cys Gly Pro Gly Thr Ala Ala Trp Thr Thr Ser Ser Leu Ala Cys  
 20 25 30  
 35 Ala Gln Gly Pro Glu Phe Trp Cys Gln Ser Leu Glu Gln Ala Leu Gln  
 35 40 45  
 Cys Arg Ala Leu Gly His Cys Leu Gln Glu Val Trp Gly His Val Gly  
 50 55 60  
 40 Ala Asp Asp Leu Cys Gln Glu Cys Glu Asp Ile Val His Ile Leu Asn  
 65 70 75 80  
 Lys Met Ala Lys Glu Ala Ile Phe Gln Asp Thr Met Arg Lys Phe Leu  
 85 90 95  
 45 Glu Gln Glu Cys Asn Val Leu Pro Leu Lys Leu Leu Met Pro Gln Cys  
 100 105 110  
 50 Asn Gln Val Leu Asp Asp Tyr Phe Pro Leu Val Ile Asp Tyr Phe Gln  
 115 120 125  
 Asn Gln Ile Asp Ser Asn Gly Ile Cys Met His Leu Gly Leu Cys Lys  
 130 135 140  
 55 Ser Arg Gln Pro Glu Pro Glu Gln Glu Pro Gly Met Ser Asp Pro Leu  
 145 150 155 160

Pro Lys Pro Leu Arg Asp Pro Leu Pro Asp Pro Leu Leu Asp Lys Leu  
 165 170 175  
 Val Leu Pro Val Leu Pro Gly Ala Leu Gln Ala Arg Pro Gly Pro His  
 180 185 190  
 Thr Gln Asp Leu Ser Glu Gln Gln Phe Pro Ile Pro Leu Pro Tyr Cys  
 195 200 205  
 Trp Leu Cys Arg Ala Leu Ile Lys Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys  
 210 215 220  
 Gly Ala Leu Arg Val Ala Val Ala Gln Val Cys Arg Val Val Pro Leu  
 225 230 235 240  
 Val Ala Gly Gly Ile Cys Gln Cys Leu Ala Glu Arg Tyr Ser Val Ile  
 245 250 255  
 Leu Leu Asp Thr Leu Leu Gly Arg Met Leu Pro Gln Leu Val Cys Arg  
 260 265 270  
 Leu Val Leu Arg Cys Ser Met Asp Asp Ser Ala Gly Pro Arg Ser Pro  
 275 280 285  
 Thr Gly Glu Trp Leu Pro Arg Asp Ser Glu Cys His Leu Cys Met Ser  
 290 295 300  
 Val Thr Thr Gln Ala Gly Asn Ser Ser Glu Gln Ala Ile Pro Gln Ala  
 305 310 315 320  
 Met Leu Gln Ala Cys Val Gly Ser Trp Leu Asp Arg Glu Lys Cys Lys  
 325 330 335  
 Gln Phe Val Glu Gln His Thr Pro Gln Leu Leu Thr Leu Val Pro Arg  
 340 345 350  
 Gly Trp Asp Ala His Thr Thr Cys Gln Ala Leu Gly Val Cys Gly Thr  
 355 360 365  
 Met Ser Ser Pro Leu Gln Cys Ile His Ser Pro Asp Leu  
 370 375 380  
 <210> 26  
 <211> 379  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 26  
 Met Ala Glu Ser His Leu Leu Gln Trp Leu Leu Leu Leu Leu Pro Thr  
 1 5 10 15  
 Leu Cys Gly Pro Gly Thr Ala Ala Trp Thr Thr Ser Ser Leu Ala Cys  
 20 25 30  
 Ala Gln Gly Pro Glu Phe Trp Cys Gln Ser Leu Glu Gln Ala Leu Gln  
 35 40 45

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|    | Cys | Arg | Ala | Leu | Gly | His | Cys | Leu | Gln | Glu | Val | Trp | Gly | His | Val | Gly |  |
|    | 50  |     |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |
| 5  | Ala | Asp | Asp | Leu | Cys | Gln | Glu | Cys | Glu | Asp | Ile | Val | His | Ile | Leu | Asn |  |
|    | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     |     | 80  |  |
|    | Lys | Met | Ala | Lys | Glu | Ala | Ile | Phe | Gln | Asp | Thr | Met | Arg | Lys | Phe | Leu |  |
|    |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |
| 10 | Glu | Gln | Glu | Cys | Asn | Val | Leu | Pro | Leu | Lys | Leu | Leu | Met | Pro | Gln | Cys |  |
|    |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |
|    | Asn | Gln | Val | Leu | Asp | Asp | Tyr | Phe | Pro | Leu | Val | Ile | Asp | Tyr | Phe | Gln |  |
| 15 |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |  |
|    | Asn | Gln | Thr | Asp | Ser | Asn | Gly | Ile | Cys | Met | His | Leu | Gly | Cys | Lys | Ser |  |
|    | 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
| 20 | Arg | Gln | Pro | Glu | Pro | Glu | Gln | Glu | Pro | Gly | Met | Ser | Asp | Pro | Leu | Pro |  |
|    | 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
|    | Lys | Pro | Leu | Arg | Asp | Pro | Leu | Pro | Asp | Pro | Leu | Leu | Asp | Lys | Leu | Val |  |
|    |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |     |  |
| 25 | Leu | Pro | Val | Leu | Pro | Gly | Ala | Leu | Gln | Ala | Arg | Pro | Gly | Pro | His | Thr |  |
|    |     |     |     | 180 |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
|    | Gln | Asp | Leu | Ser | Glu | Gln | Gln | Phe | Pro | Ile | Pro | Leu | Pro | Tyr | Cys | Trp |  |
| 30 |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
|    | Cys | Arg | Ala | Leu | Ile | Lys | Arg | Ile | Gln | Ala | Met | Ile | Pro | Lys | Gly | Ala |  |
|    | 210 |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| 35 | Leu | Arg | Val | Ala | Val | Ala | Gln | Val | Cys | Arg | Val | Val | Pro | Leu | Val | Ala |  |
|    | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
|    | Gly | Gly | Ile | Cys | Gln | Cys | Leu | Ala | Glu | Arg | Tyr | Ser | Val | Ile | Leu | Leu |  |
|    |     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
| 40 | Asp | Thr | Leu | Leu | Gly | Arg | Met | Leu | Pro | Gln | Leu | Val | Cys | Arg | Leu | Val |  |
|    |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
|    | Leu | Arg | Cys | Ser | Met | Asp | Asp | Ser | Ala | Gly | Pro | Arg | Ser | Pro | Thr | Gly |  |
| 45 |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |
|    | Glu | Trp | Leu | Pro | Arg | Asp | Ser | Glu | Cys | His | Leu | Cys | Met | Ser | Val | Thr |  |
|    | 290 |     |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |
| 50 | Thr | Gln | Ala | Gly | Asn | Ser | Ser | Glu | Gln | Ala | Ile | Pro | Gln | Ala | Met | Leu |  |
|    | 305 |     |     |     | 310 |     |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |
|    | Gln | Ala | Cys | Val | Gly | Ser | Trp | Leu | Asp | Arg | Glu | Lys | Cys | Lys | Gln | Phe |  |
|    |     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |
| 55 | Val | Glu | Gln | His | Thr | Pro | Gln | Leu | Leu | Thr | Leu | Val | Pro | Arg | Gly | Trp |  |
|    |     |     |     | 340 |     |     |     | 345 |     |     |     |     |     | 350 |     |     |  |

Asp Ala His Thr Thr Cys Gln Ala Leu Gly Val Cys Gly Thr Met Ser  
 355 360 365  
 Ser Pro Leu Gln Cys Ile His Ser Pro Asp Leu  
 5 370 375  
 <210> 27  
 10 <211> 527  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 27  
 15 Met Tyr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Ala Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Pro Val Leu Gly Leu Lys Glu Cys Thr Arg Gly Ser Ala Val Trp  
 20 20 25 30  
 Cys Gln Asn Val Lys Thr Ala Ser Asp Cys Gly Ala Val Lys His Cys  
 35 40 45  
 Leu Gln Thr Val Trp Asn Lys Pro Thr Val Lys Ser Leu Pro Cys Asp  
 25 50 55 60  
 Ile Cys Lys Asp Val Val Thr Ala Ala Gly Asp Met Leu Lys Asp Asn  
 65 70 75 80  
 30 Ala Thr Glu Glu Glu Ile Leu Val Tyr Leu Glu Lys Thr Cys Asp Trp  
 85 90 95  
 Leu Pro Lys Pro Asn Met Ser Ala Ser Cys Lys Glu Ile Val Asp Ser  
 35 100 105 110  
 Tyr Leu Pro Val Ile Leu Asp Ile Ile Lys Gly Glu Met Ser Arg Pro  
 115 120 125  
 Gly Glu Val Cys Ser Ala Leu Asn Leu Cys Glu Ser Leu Gln Lys His  
 40 130 135 140  
 Leu Ala Glu Leu Asn His Gln Lys Gln Leu Glu Ser Asn Lys Ile Pro  
 145 150 155 160  
 45 Glu Leu Asp Met Thr Glu Val Val Ala Pro Phe Met Ala Asn Ile Pro  
 165 170 175  
 Leu Leu Leu Tyr Pro Gln Asp Gly Pro Arg Ser Lys Pro Gln Pro Lys  
 50 180 185 190  
 Asp Asn Gly Asp Val Cys Gln Asp Cys Ile Gln Met Val Thr Asp Ile  
 195 200 205  
 55 Gln Thr Ala Val Arg Thr Asn Ser Thr Phe Val Gln Ala Leu Val Glu  
 210 215 220  
 His Val Lys Glu Glu Cys Asp Arg Leu Gly Pro Gly Met Ala Asp Ile  
 225 230 235 240



Cys Lys Asn Tyr Ile Ser Gln Tyr Ser Glu Ile Ala Ile Gln Met Met  
 245 250 255  
 5 Met His Met Gln Asp Gln Gln Pro Lys Glu Ile Cys Ala Leu Val Gly  
 260 265 270  
 Phe Cys Asp Glu Val Lys Glu Met Pro Met Gln Thr Leu Val Pro Ala  
 275 280 285  
 10 Lys Val Ala Ser Lys Asn Val Ile Pro Ala Leu Glu Leu Val Glu Pro  
 290 295 300  
 Ile Lys Lys His Glu Val Pro Ala Lys Ser Asp Val Tyr Cys Glu Val  
 15 305 310 315 320  
 Cys Glu Phe Leu Val Lys Glu Val Thr Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys  
 325 330 335  
 20 Thr Glu Lys Glu Ile Leu Asp Ala Phe Asp Lys Met Cys Ser Lys Leu  
 340 345 350  
 Pro Lys Ser Leu Ser Glu Glu Cys Gln Glu Val Val Asp Thr Tyr Gly  
 355 360 365  
 25 Ser Ser Ile Leu Ser Ile Leu Leu Glu Glu Val Ser Pro Glu Leu Val  
 370 375 380  
 Cys Ser Met Leu His Leu Cys Ser Gly Thr Arg Leu Pro Ala Leu Thr  
 30 385 390 395 400  
 Val His Val Thr Gln Pro Lys Asp Gly Gly Phe Cys Glu Val Cys Lys  
 405 410 415  
 35 Lys Leu Val Gly Tyr Leu Asp Arg Asn Leu Glu Lys Asn Ser Thr Lys  
 420 425 430  
 Gln Glu Ile Leu Ala Ala Leu Glu Lys Gly Cys Ser Phe Leu Pro Asp  
 435 440 445  
 40 Pro Tyr Gln Lys Gln Cys Asp Gln Phe Val Ala Glu Tyr Glu Pro Val  
 450 455 460  
 Leu Ile Glu Ile Leu Val Glu Val Met Asp Pro Ser Phe Val Cys Leu  
 45 465 470 475 480  
 Lys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Ala His Lys Pro Leu Leu Gly Thr Glu  
 485 490 495  
 50 Lys Cys Ile Trp Gly Pro Ser Tyr Trp Cys Gln Asn Thr Glu Thr Ala  
 500 505 510  
 Ala Gln Cys Asn Ala Val Glu His Cys Lys Arg His Val Trp Asn  
 515 520 525  
 55

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 523

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

5 &lt;400&gt; 28

Met Tyr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Ala Leu Ala  
 1 5 10 15

10 Gly Pro Val Leu Gly Leu Lys Glu Cys Thr Arg Gly Ser Ala Val Trp  
 20 25 30

Cys Gln Asn Val Lys Thr Ala Ser Asp Cys Gly Ala Val Lys His Cys  
 35 40 45

15 Leu Gln Thr Val Trp Asn Lys Pro Thr Val Lys Ser Leu Pro Cys Asp  
 50 55 60

Ile Cys Lys Asp Val Val Thr Ala Ala Gly Asp Met Leu Lys Asp Asn  
 65 70 75 80

20 Ala Thr Glu Glu Glu Ile Leu Val Tyr Leu Glu Lys Thr Cys Asp Trp  
 85 90 95

25 Leu Pro Lys Pro Asn Met Ser Ala Ser Cys Lys Glu Ile Val Asp Ser  
 100 105 110

Tyr Leu Pro Val Ile Leu Asp Ile Ile Lys Gly Glu Met Ser Arg Pro  
 115 120 125

30 Gly Glu Val Cys Ser Ala Leu Leu Cys Glu Ser Leu Gln Lys His Leu  
 130 135 140

Ala Glu Leu Asn His Gln Lys Gln Leu Glu Ser Asn Lys Ile Pro Glu  
 145 150 155 160

35 Leu Asp Met Thr Glu Val Val Ala Pro Phe Met Ala Asn Ile Pro Leu  
 165 170 175

40 Leu Leu Tyr Pro Gln Asp Gly Pro Arg Ser Lys Pro Gln Pro Lys Asp  
 180 185 190

Asn Gly Asp Val Cys Gln Asp Cys Ile Gln Met Val Thr Asp Ile Gln  
 195 200 205

45 Thr Ala Val Arg Thr Asn Ser Thr Phe Val Gln Ala Leu Val Glu His  
 210 215 220

Val Lys Glu Glu Cys Asp Arg Leu Gly Pro Gly Met Ala Asp Ile Cys  
 225 230 235 240

50 Lys Asn Tyr Ile Ser Gln Tyr Ser Glu Ile Ala Ile Gln Met Met Met  
 245 250 255

55 His Met Gln Pro Lys Glu Ile Cys Ala Leu Val Gly Phe Cys Asp Glu  
 260 265 270

Val Lys Glu Met Pro Met Gln Thr Leu Val Pro Ala Lys Val Ala Ser  
 275 280 285

Lys Asn Val Ile Pro Ala Leu Glu Leu Val Glu Pro Ile Lys Lys His  
 290 295 300

5 Glu Val Pro Ala Lys Ser Asp Val Tyr Cys Glu Val Cys Glu Phe Leu  
 305 310 315 320

Val Lys Glu Val Thr Lys Leu Ile Asp Asn Asn Lys Thr Glu Lys Glu  
 325 330 335

10 Ile Leu Asp Ala Phe Asp Lys Met Cys Ser Lys Leu Pro Lys Ser Leu  
 340 345 350

Ser Glu Glu Cys Gln Glu Val Val Asp Thr Tyr Gly Ser Ser Ile Leu  
 15 355 360 365

Ser Ile Leu Leu Glu Glu Val Ser Pro Glu Leu Val Cys Ser Met Leu  
 370 375 380

20 His Leu Cys Ser Gly Thr Arg Leu Pro Ala Leu Thr Val His Val Thr  
 385 390 395 400

Gln Pro Lys Asp Gly Gly Phe Cys Glu Val Cys Lys Lys Leu Val Gly  
 405 410 415

25 Tyr Leu Asp Arg Asn Leu Glu Lys Asn Ser Thr Lys Gln Glu Ile Leu  
 420 425 430

Ala Ala Leu Glu Lys Gly Cys Ser Phe Leu Pro Asp Pro Tyr Gln Lys  
 30 435 440 445

Gln Cys Asp Gln Phe Val Ala Glu Tyr Glu Pro Val Leu Ile Glu Ile  
 450 455 460

35 Leu Val Glu Val Met Asp Pro Ser Phe Val Cys Leu Lys Ile Gly Ala  
 465 470 475 480

Cys Pro Ser Ala His Lys Pro Leu Leu Gly Thr Glu Lys Cys Ile Trp  
 485 490 495

40 Gly Pro Ser Tyr Trp Cys Gln Asn Thr Glu Thr Ala Ala Gln Cys Asn  
 500 505 510

Ala Val Glu His Cys Lys Arg His Val Trp Asn  
 45 515 520

<210> 29  
 50 <211> 380  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 29  
 55 Met Ala Glu Ser His Leu Leu Gln Trp Leu Leu Leu Leu Leu Pro Thr  
 1 5 10 15

Leu Cys Gly Pro Gly Thr Ala Ala Trp Thr Thr Ser Ser Leu Ala Cys

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
|    | Ala | Gln | Gly | Pro | Glu | Phe | Trp | Cys | Gln | Ser | Leu | Glu | Gln | Ala | Leu | Gln |
|    |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| 5  | Cys | Arg | Ala | Leu | Gly | His | Cys | Leu | Gln | Glu | Val | Trp | Gly | His | Val | Gly |
|    |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| 10 | Ala | Asp | Asp | Leu | Cys | Gln | Glu | Cys | Glu | Asp | Ile | Val | His | Ile | Leu | Asn |
|    | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
|    | Lys | Met | Ala | Lys | Glu | Ala | Ile | Phe | Gln | Asp | Thr | Met | Arg | Lys | Phe | Leu |
|    |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| 15 | Glu | Gln | Glu | Cys | Asn | Val | Leu | Pro | Leu | Lys | Leu | Leu | Met | Pro | Gln | Cys |
|    |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
|    | Asn | Gln | Val | Leu | Asp | Asp | Tyr | Phe | Pro | Leu | Val | Ile | Asp | Tyr | Phe | Gln |
|    |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| 20 | Asn | Gln | Thr | Asp | Ser | Asn | Gly | Ile | Cys | Met | His | Gly | Leu | Cys | Lys | Ser |
|    |     |     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| 25 | Arg | Gln | Pro | Glu | Pro | Glu | Gln | Glu | Pro | Gly | Met | Ser | Asp | Pro | Leu | Pro |
|    | 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
|    | Lys | Pro | Leu | Arg | Asp | Pro | Leu | Pro | Asp | Pro | Leu | Leu | Asp | Lys | Leu | Val |
|    |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| 30 | Leu | Pro | Val | Leu | Pro | Gly | Ala | Leu | Gln | Ala | Arg | Pro | Gly | Pro | His | Thr |
|    |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
|    | Gln | Asp | Leu | Ser | Glu | Gln | Gln | Phe | Pro | Ile | Pro | Leu | Pro | Tyr | Cys | Trp |
|    |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| 35 | Leu | Cys | Arg | Ala | Leu | Ile | Lys | Arg | Ile | Gln | Ala | Met | Ile | Pro | Lys | Gly |
|    |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| 40 | Ala | Leu | Ala | Val | Ala | Val | Ala | Gln | Val | Cys | Arg | Val | Val | Pro | Leu | Val |
|    | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
|    | Ala | Gly | Gly | Ile | Cys | Gln | Cys | Leu | Ala | Glu | Arg | Tyr | Ser | Val | Ile | Leu |
|    |     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| 45 | Leu | Asp | Thr | Leu | Leu | Gly | Arg | Met | Leu | Pro | Gln | Leu | Val | Cys | Arg | Leu |
|    |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
|    | Val | Leu | Arg | Cys | Ser | Met | Asp | Asp | Ser | Ala | Gly | Pro | Arg | Ser | Pro | Thr |
|    |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| 50 | Gly | Glu | Trp | Leu | Pro | Arg | Asp | Ser | Glu | Cys | His | Leu | Cys | Met | Ser | Val |
|    |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| 55 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

Phe Val Glu Gln His Thr Pro Gln Leu Leu Thr Leu Val Pro Arg Gly  
 340 345 350

5 Trp Asp Ala His Thr Thr Cys Gln Ala Leu Gly Val Cys Gly Thr Met  
 355 360 365

Ser Ser Pro Leu Gln Cys Ile His Ser Pro Asp Leu  
 370 375 380

10

<210> 30  
 <211> 4124  
 15 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 30  
 20 atgagagaat gggttctgct catgtccgtg ctgctctgtg gcctggctgg cccacacac 60  
 ctgttccagc caagcctggg gctggacatg gccaaaggctc tcttggataa ctactgcttc 120  
 ccggagaacc tgctgggcat gcaggaagcc atccagcagg ccatcaagag ccatgagatt 180  
 ctgagcatct cagacccgca gacgtggcc agtgtgctga cagccggggg gcagagctcc 240  
 ctgaacgac ctcgcctggg catctctat gagccagca ccccgagcc tccccacaa 300  
 gtcccagcac tcaccagcct ctcaagaag gaactgcttg cctggctgca aaggggctc 360  
 25 cgccatgagg ttctggagg taatgtggg tacctgcggg tggacagcgt cccgggccag 420  
 gaggtgctga gcatgatggg ggagttcctg gtggcccacg tgtgggggaa tctcatggg 480  
 acctccgct tagtgctgga tctccggcac tgcacaggag gccagggtctc tggcattccc 540  
 tacatcatct cctacctgca cccagggaac accatctctc acgtggacac tatctacaac 600  
 cgccctcca acaccaccac ggagatctgg accttgcccc aggtcctggg agaaaggtag 660  
 30 ggtgccgaca aggatgtggg ggtcctcacc agcagccaga ccaggggctg ggccgaggac 720  
 atcgcgaca tccttaagca gatgcgcagg gccatcgtgg tgggcgagcg gactggggga 780  
 ggggcccctg acctccggaa gctgaggata ggcgagtctg acttcttctt caccgtgccc 840  
 gtgtccaggc ccttggggcc ccttgggtgga ggcagccaga cgtgggaggg cagcgggggtg 900  
 ctgccctgtg tggggactcc ggccgagcag gccctggaga aagccctggc catcctcact 960  
 35 ctgcgagcgc ccttccagg ggtagtcac tgcctccagg aggtcctgaa ggactactac 1020  
 acgctgggtg accgtgtgcc caccctgtg cagcacttgg ccagcatgga cttctccacg 1080  
 gtgggtctcc aggaagatct ggtcaccagg ctcaatgccg gcctgcaggc tgcgtctgag 1140  
 gatccaggc tcctgggtgc agccatcggg cccacagaaa ctcttcttg gcccgcccc 1200  
 gacgtgcag ccgaagactc accaggggtg gcccagagt tgcctgagga cgaggctatc 1260  
 40 cggcaagcac tgggtgactc tgtgttccag gtgtcggtgc tgccaggcaa tgtgggtac 1320  
 ctgcgcttcg atagttttgc tgacgctcc gtcctgggtg tgttggcccc atatgtcctg 1380  
 cgccagggtg gggagccgct acaggacacg gagcacctca tcatggacct gcgccacaac 1440  
 cctggagggc catcctctgc tgtgccctg ctctgtcct acttccaggg cctgaggcc 1500  
 ggccccgtgc acctcttcac cacctatgat cgccgacca acatcacgca ggagcacttc 1560  
 45 agccacatgg agctcccggg cccacgctac agcacccaac gtggggtgta tctgtcacc 1620  
 agccaccgca ccgccacggc cgcggaggag ttgccttcc ttatgcagtc gctgggctgg 1680  
 gccacactgg taggtgagat caccgcgggc aacctgtgc acaccgcac ggtgccgctg 1740  
 ctggacacac ccgaaggcag cctcgcgctc accgtgccgg tcctcacctt catcgacaat 1800  
 cacggcgagg cctggctggg tgggtgagtg gtgccgatg ccatcgtgct ggccgaggag 1860  
 50 gccctggaca aagcccagga agtgcaggag ttccacaaa gcctgggggc cttggtggag 1920  
 ggcacagggc acctgtgga ggccactat gctcggccag aggtcgtggg gcagaccagt 1980  
 gccctcctgc gggccaagct ggccagggc gcctaccgca cagctgtgga cttggagtct 2040  
 ctggcctctc agctcacagc agacctccag gaggtgtctg gggaccaccg cttgctagt 2100  
 ttccacagcc ctggcgagct ggtggtagag gaagacccc caccacccc tgctgtccc 2160  
 55 tctccagagg agctcaccta cttattgag gccctgttca agacagagg gctgcccgcc 2220  
 cagctgggct acctgcgttt tgacgccatg gctgaactgg agacagtga ggccgtgggg 2280  
 ccacagctgg tgcggctggg atggaacag ctggtggaca cggctgcgt ggtgatcgac 2340  
 ctgcgctaca accctggcag ctactccacg gccatccgc tgctctgctc ctacttctt 2400

gaggcagagc cccgccagca cctgtattct gtctttgaca gggccacctc aaaagtcacg 2460  
 gaggtgtgga ccttgcccca ggctgcgggc cagcgctacg gctcacacaa ggacctctac 2520  
 atcctgatga gccacaccag tggctctgcg gccgaggcct ttgcacacac catgcaggac 2580  
 ctgcagcggg ccacggtcat tggggagccc acggccggag gcgcactctc tgtgggcatc 2640  
 5 taccaggtgg gcagcagccc cttatatgca tccatgccca cccagatggc catgagtgcc 2700  
 accacaggca aggcctggga cctggctggt gtggagcccg acatcactgt gcccattgagc 2760  
 gaagcccttt ccatagccca ggacatagtg gctctgcgtg ccaaggtgcc cacggtgctg 2820  
 cagacggccg ggaagctggt ggctgataac tatgcctctg ccgagctggg ggccaagatg 2880  
 gccaccaaac tgagcgggtc gcagagccgc tactccaggg tgacctcaga agtggcccta 2940  
 10 gccgagatcc tgggggctga cctgcagatg ctctccggag acccacacct gaaggcagcc 3000  
 catatccctg agaatgccaa ggaccgcatt cctggaattg tgcccatgca gatcccttcc 3060  
 cctgaagtat ttgaagagct gatcaagttt tccttcaca ctaacgtgct tgaggacaac 3120  
 attggctact tgaggtttga catgtttggg gacggtgagc tgctcaccca ggtctccagg 3180  
 ctgctggtgg agcacatctg gaagaagatc atgcacacgg atgccatgat catcgacatg 3240  
 15 aggttcaaca tcggtggccc cacatcctcc attcccatct tgtgctccta cttctttgat 3300  
 gaaggccctc cagttctgct ggacaagatc tacagccggc ctgatgactc tgtcagtga 3360  
 ctctggacac acgcccagg ttaggtgaa cgctatggct ccaagaagag catggtcatt 3420  
 ctgaccagca gtgtgacggc cggcaccgag gaggagtcca cctatatcat gaagaggctg 3480  
 ggccggggccc tggctattgg ggaggtgacc agtgggggct gccagccacc acagacctac 3540  
 20 cacgtggatg acaccaacct ctacctcact atccccacgg cccgttctgt gggggcctcg 3600  
 gatggcagct cctgggaagg ggtgggggtg acaccccatg tggttgtccc tgcagaagag 3660  
 gctctgcaca gggccaagga gatgctccag cacaaccagc tgagggtgaa gcggagccca 3720  
 ggccctgcagg accacctgta gggaagggcc ccataggcag agccccaggg cagacagaac 3780  
 ctctgggaca cacaccaagg gcaactcctg aggtggcccg gcctgagggt cccaggagca 3840  
 25 gcaaagggggc ctgctgagct ctggttaggt tacagctgga ggtgtgtata tatacacaca 3900  
 cacacatgta tatacacata tatatgtgta tgtatatata tgtatatata tatggctttc 3960  
 caataaccac ctaaatttta acaaagggtc cttctaagtg gtagaacttg ggggtggtatt 4020  
 ttacaccttc ttcttcatac tttgtctctt ttcttaataa ctcattaatg tgcataatc 4080  
 attattttca gatgcagcta tcattattcc aaaatacaaa ataa 4124  
 30  
 <210> 31  
 <211> 579  
 <212> ADN  
 35 <213> Homo sapiens  
 <400> 31  
 atgcarwsny tnatgcargc nccnytnytn athgcnytn gnytnytnyt ngcnacnccn 60  
 gncargcnc ayytnaaraa rccnwsncar ytnwsnwsnt tywsntggga yaaytgygay 120  
 40 garggnaarg aycngcngt nathmgnwsn ytnacnytn arcngaycc nathgtngtn 180  
 ccnggnaayg tnacnytnws ngtngtnggn wsnacnwsn tncnytnws nwsnccnytn 240  
 aargtngayy tngtnytna raargargtn gcnggnytn ggathaarat hccntgyacn 300  
 gaytayathg gnwsntgyac nttygarcay ttytgygayg tnytngayat gytnathccn 360  
 acngngarc cntgyccnga rccnytnmgn acntayggny tncntgyca ytgyccntty 420  
 45 aargarggna cntaywsnyt nccnaarwsn garttygtng tncngayyt ngarytnccn 480  
 wsntggytna cnacnggnaa ytaymgnath garwsngtny tnwsnwsnws nggnaarmgn 540  
 ytnggntgya thaarathgc ngcnwsnytn aarggnath 579  
 50  
 <210> 32  
 <211> 633  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 55 <400> 32  
 tttctttgcg taaccaatac tgggaaggcat ttaaaggacc tctgccgcct cagaccttgc 60  
 agttaactcc gccctgacct acccttcccc atgcagtcct tgatgcagge tcccctcctg 120  
 atcgccctgg gcttgcttct cgcgacctct gcgcaagccc acctgaaaaa ggtgagtgc 180

ccctctttta agagtctgtt tgcagcctcc tggcccagct acgggtgtgc gggctctggct 240  
 gagatatggg ggtggccact cegtctctta gaattgggtc tctgcactag agccttccaa 300  
 agtaactaat tatgggattc tggctctgtac aatgaggggtg gcctctaaag acttggtctg 360  
 ctccaggccc tttttggaga gattaatctc acgtctgcac tctcctgccc tccctccaag 420  
 5 cgccggagtg aaaatgcaga cagccttaaa actaaggcat tgcccccaag agattcagtc 480  
 ctgttaaccc tgcaccttac tcctgacccc cactccttat gtcccccattg ataaggcctg 540  
 ctgcctcatc tcttccctcg ctogaatgcc ctgaggtctt cctgagagtt gggaggggtt 600  
 gagagccttc caaggccaag aggattcact aag 633

10

<210> 33  
 <211> 1047  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15

<400> 33  
 caggagcttg ccctcttctt gggattccaa cgctggctgg agaggagtgg gcagcaggga 60  
 ggtgggaagt cagagaaggt gcccacaaa ggcctattag gtcagtctcc tgtttggaag 120  
 ttccaggctc atcatatcct gccttatagt ttacaataca cttttgggag attatgtctt 180  
 20 ttgagctctt tagtttagtc ctgcctataa aatgagtagg ataagtgtta tcccagggtc 240  
 ataggatatg agtctcatag atgaggctca gggacggggg tgccctcacc aaggtcacac 300  
 tgccaggagc tcatttttcc tgtgatctgt gatagtttct tttgtcaacc ttttcttctt 360  
 tctccttctt tgcctgctga ttgtccccag ccatccagc tcagtagctt ttcctgggat 420  
 aactgtgatg aagggaagga ccctgcggtg atcagaagcc tgactctgga gcctgacccc 480  
 25 atcgtcgttc ctggaaatgt gaccctcagt gtcgtgggca gcaccagtgt ccccttagt 540  
 tctcctctga aggtgagcct ggggggtggg ggagaagggg aggtgagagg gtctggccag 600  
 caggggtact ggggcatgta tgcttgggga actgtgaaga atttcagaat cctggattcc 660  
 cagagaatag tacaggacat gtagattcag acactcttcc acaggttcat ggaatctcag 720  
 gatcataaga ttgaaaggaa tctctgatgt cagcgccagc aacttcctgg tgagggcagg 780  
 30 agtgacggat accttgacc tggcagaagc gtcctggcct tctctgggcc tgggtggccaa 840  
 ctgctcatta ttatctgaca gctctggttg gccaatttgg ttttgctgtt aattataaaa 900  
 ttgatatacc aattagccag taatatatag tcactttaga aaacacaagt ggtcaaaaaa 960  
 taaataaaat aggccaagtg tggtaaactc atgcctgtaa tccccacacc cttaggaggc 1020  
 tgaaggtggg tgggatcctt tttgagg 1047

35

<210> 34  
 <211> 1706  
 <212> ADN  
 40 <213> Homo sapiens

40

<400> 34  
 acagtagatg ccagtgcatt tcaatgcaag tgtagagcc aatcaatggg tagtgactac 60  
 ctaaagaatt ttaagactat ggattgagca tgatggctca cggcctgtaa tcccagcctt 120  
 45 tgggaaggta aggtgaaagg attgcttgag gccaggagtt ccagaccagc ttgggcaaca 180  
 aagttagccc catctctaca aaaaatacaa aattagctgg gtgtggtggc atgtgcctgt 240  
 ctgtgtttcc cacctacatg ggaggctgag gcaggaggat cgtctgagcc caggagtttg 300  
 aggctgcagt gagtgcagtg agccatgata caaaaaaaaa aaataaagaa ttctaagctc 360  
 atgtatagtt cagtgtaggg ggaaaattca catttgatta ttaatgtctg ccatgggcac 420  
 50 aataatacac tatactcaca catgggccac aatgttgcca ttcctagaac agactatctc 480  
 taagatctca tccagttaaa aattctatga ttaaaatata ttgctgcttt tttgaagaca 540  
 gaagagctgg tatgtttgcc ctggaattta cacttataac ctttttcaaa cctttgtttt 600  
 attttttttt accaggtgga tttagttttg gagaaggagg tggctggcct ctggatcaag 660  
 atcccatgca cagactacat tggcagctgt acctttgaac acttctgtga tgtgcttgac 720  
 55 atgttaattc ctactgggga gcctgcccc gagccctgc gtacctatgg gcttccttgc 780  
 cactgtccct tcaaaagaat aagtacttag ggaggagaga gcgttaccct tgtggctaaa 840  
 gagatggggg ttggagagaa gggctcttgc attctccttc tgcagatctg catgtctctg 900  
 gatttgtaag ccagtgtgac ctatcaggaa tcacttatct tccgggagcc tcagttatcc 960

atctacgaaa tgggagactt gaacttagat gtgatcttca gggcccttta tccatataat 1020  
 ccatgctcta cagtgcctatg gccgtctctc atcttgctcg gctgttttga gaatgggaag 1080  
 aggggtggta gttcatggct gcaatcctag cagtggctct agggaaaaga ccccatcagt 1140  
 5 aggcctccac tgactggcgg tccactggct tccccgcagg gaacctactc actgccaag 1200  
 agcgaattcg ttgtgcctga cctggagctg cccagttggc tcaccaccgg gaactaccgc 1260  
 atagagagcg tcctgagcag cagtgggaag cgtctgggct gcatcaagat cgctgcctct 1320  
 ctaaagggca tatagcatgg catctgccac agcagaatgg agcgggtgtga ggaagggtccc 1380  
 ttttctctcg ttttgtgttt gccaaaggcca aactcccact ctctgcccc ctttaatccc 1440  
 ctttctacag tgagtccact accctcactg aaaatcattt tgtaccactt acatttttagg 1500  
 10 ctgggggcaag cagccctgac ctaagggaga atgagttgga cagttcttga tagcccaggg 1560  
 catctgctgg gctgaccacg ttactcatcc ccgttaacat tctctctaaa gagcctcggt 1620  
 catttccaaa gcagttaagg aatgggaaca gagtggttta ggacctgaag aatctttatg 1680  
 actctctctc tttctctctt tttttt 1706

15 <210> 35  
 <211> 633  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 35  
 tttcttttgcg taaccaatac tgggaaggcat tttaaaggacc tctgccgcct cagaccttgc 60  
 agttaactcc gccctgacct acccttcccc atgcagtccc tgatgcaggc tccccctctg 120  
 atcgccctgg gcttgcttct cgcgacccct gcgcaagccc acctgaaaaa ggtgagtgc 180  
 25 cctcttttta agagtctgtt tgacgcctcc tggcccagct acgggtgtgc ggggtctggct 240  
 gagatatggg ggtggccact ccgttctcta gaattggtt cctgactag agccttccaa 300  
 agtaactaat tatgggattc tgggtctgtac aatgagggtg gcctctaaag acttgttctg 360  
 ctccaggccc tttttggaga gattaatctc acgtctgcac tctctgccc tccctccaa 420  
 cgccggagtg aaaatgcaga cagccttaaa actaaggcat tgcccccaag agattcagtc 480  
 30 ctgttaaccc tgcaccttac tctgacccc cactccttat gtcccccatg ataaggcctg 540  
 ctgcctcatc tcttcccctg ctgcaatgcc ctgaggtctt cctgagagtt gggagggttt 600  
 gagagctttc caaggccaag aggattcact aag 633

35 <210> 36  
 <211> 1047  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

40 <400> 36  
 caggagcttg ccctcttgcg gggattccaa cgctggctgg agaggagtgg gcagcagggga 60  
 ggtgggaagt cagagaaggc gccacccaaa ggctatttag gtcagtctcc tgtttggaag 120  
 ttccaggctc atcatatcct gccttatagt ttacaataca cttttgggag attatgtctt 180  
 ttgagtcttt tagtttagtc ctgcctataa aatgagtagg ataagtgtta tccagggttc 240  
 45 ataggatagg agtctcatag atgaggctca gggacggggg tgccctaccc aaggtcacac 300  
 tgccaggagc tcatttttcc tgtgatctgt gatagtttct tttgtcaacc ttttctctct 360  
 tctccttcc tgcctcctga ttgtccccag ccatcccagc tcagtagctt ttcttgggat 420  
 aactgtgatg aagggaagga ccctgcggtg atcagaagcc tgactctgga gcctgacccc 480  
 atcgtcgttc ctggaaatgt gaccctcagt gtcgtgggca gcaccagtgt cccctcaggt 540  
 50 tctcctctga aggtgagcct ggggggtggg ggagaagggg aggtgagagg gtctggccag 600  
 caggggtact ggggcagcta tgcttgggga actgtgaaga atttcagaat cctggattcc 660  
 cagagaatag tacaggacat gtgattcag acactcttcc acaggttcat ggaatctcag 720  
 gatcataaga ttgaaaggaa tctctgatgt cagcgcacgc aacttcctgg tgagggcagg 780  
 agtgacggat acctgacac tggcagaagc gtcttggcct tctctgggccc tgggtggccaa 840  
 55 ctgctcatta ttatctgaca gctctggttg gccaatgttg ttttgcgtgt aattataaaa 900  
 ttgatatacc aattagccag taatatatag tcactttaga aaacacaagt ggtcaaaaaa 960  
 taaataaaat aggccaagtg tggtaacttc atgcctgtaa ttcccacacc ctaggaggc 1020  
 tgaagggtggg tgggacccct tttgagg 1047



<210> 37  
 <211> 1706  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 37  
 10 acagtagatg ccagtgcatt tcaatgcaag tgttagagcc aatcaatggg tagtgactac 60  
 ctaaagaatt ttaagactat ggattgagca tgatggctca cggcctgtaa tcccagcctt 120  
 tgggaaggatg aggtgaaagg attgcttgag gccaggagtt ccagaccagc ttgggcaaca 180  
 aagttagagcc catctctaca aaaaatacaa aattagctgg gtgtgggtggc atgtgcctgt 240  
 ctgtgtttcc cacctacatg ggaggtcagc gcaggaggat cgtctgagcc caggagtttg 300  
 aggtcgcagt gagtgcagtg agccatgata caaaaaaaaa aaataaagaa ttctaagtct 360  
 15 atgtatagtt cagtgtaggg ggaaaattca catttgatta ttaatgtctg ccatggggcac 420  
 aataatacac tatactcaca catgggccac aatgttgcca ttcctagaac agactatctc 480  
 taagatctca tccagttaaa aattctatga ttaaaatata ttgctgcttt tttgaagaca 540  
 gaagagctgg tatgtttgcc ctggaattta cacttataac ctttttcaaa cttttgtttt 600  
 attttttttt accagggtgga tttagttttg gagaaggagg tggctggcct ctggatcaag 660  
 20 atcccatgca cagactacat tggcagctgt acctttgaac acttctgtga tgtgcttgac 720  
 atgttaattc ctactgggga gccctgcccga gagcccctgc gtacctatgg gcttccttgc 780  
 cactgtccct tcaaagaagt aagtacttag ggaggagaga gcgttacctc tgtgggctaaa 840  
 gagatggggg ttggagagaa gggctcttgc attctccttc tgcagatctg catgtctctg 900  
 gattttgtaag ccagtgtgac ctatcaggaa tcacttatct tccgggagcc tcagttatcc 960  
 25 atctacgaaa tgggagactt gaacttagat gtgactttca gggcccttta tccatataat 1020  
 ccatgctcta cagtgtctat gccgtctctc atcttgtgcg gctgttttga gaatgggaag 1080  
 aggggtggta gttcatggct gcaatcctag cagtggctct aggagaaaga ccccatcagt 1140  
 aggtccccc tgactggcgg tccactggct tccccgcagg gaacctactc actgcccagg 1200  
 agcgaattcg ttgtgcctga cctggagctg cccagttggc tcaccaccgg gaactaccgc 1260  
 30 atagagagcg tccctgagcag cagtgggaag cgtctgggct gcatcaagat cgctgcctct 1320  
 ctaaagggca tatagcatgg catctgccac agcagaatgg agcgggtgtga ggaaggtccc 1380  
 ttttctctcg ttttgtgttt gccaaaggcca aactcccact ctctgcccc ctttaatccc 1440  
 ctttctacag tgagtccact accctcactg aaaaatcattt tgtaccactt acattttagg 1500  
 ctggggcaag cagccctgac ctaagggaga atgagttgga cagtctctga tagcccaggg 1560  
 35 catctgctgg gctgaccacg ttactcatcc ccgttaacat tctctctaaa gagcctcggt 1620  
 catttccaaa gcagttaagg aatgggaaca gagtgtttta ggacctgaag aatctttatg 1680  
 actctctctc tttctctctt tttttt 1706  
  
 40 <210> 38  
 <211> 1043  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 45 <400> 38  
 tttcttttgcg taaccaatac tggaaggcat ttaaaggacc tctgccgcct cagaccttgc 60  
 agttaactcc gccctgaccc acccttcccg atgcagtccc tgatgcaggc tcccctcctg 120  
 atcgccctgg gcttgettct cgcgaccctc gcgcaagccc acctgaaaaa gccatcccag 180  
 ctcagtagct tttcctggga taactgtgat gaagggaagg acctgcgggt gatcagaagc 240  
 50 ctgactctgg agcctgaccc catcgtcgtt cctggaaatg tgacctcag tgcgtgggc 300  
 agcaccagtg tccccctgag ttctcctctg aagggtgatt tagttttgga gaaggaggtg 360  
 gctggcctct ggatcaagat cccatgcaca gactacattg gcagctgtac ctttgaacac 420  
 ttctgtgatg tgcttgacat gttaattcct actggggagc cctgcccaga gccctgcgt 480  
 acctatgggc ttccttgcca ctgtcccttc aaagaaggaa cctactcact gcccagagc 540  
 55 gaattcggtg tgcctgacct ggagctgccc agttggctca ccaccgggaa ctaccgcata 600  
 gagagcgtcc tgagcagcag tgggaagcgt ctgggctgca tcaagatcgc tgctctcta 660  
 aagggcataat agcatggcat ctgccacagc agaatggagc ggtgtgagga aggtcccttt 720  
 tcctctgttt tgtgtttgcc aaggccaaac tcccactctc tgccccctt taatccccct 780

tctacagtga gtccactacc ctccactgaaa atcattttgt accactttaca ttttaggctg 840  
 gggcaagcag ccctgaccta agggagaatg agttggacag ttcttgatag cccagggcat 900  
 ctgctgggct gaccacgtta ctcatccccg ttaacattct ctctaaagag cctcgttcat 960  
 ttccaaagca gttaaggaat gggaacagag tgtttttagga cctgaagaat ctttatgact 1020  
 5 ctctctcttt ctctcttttt ttt 1043

<210> 39  
 <211> 1047  
 10 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 39  
 15 caggagcttg ccctcttgct gggattccaa cgctggcttg agaggagtgg gcagcaggga 60  
 ggtgggaagt cagagaaggt gcccacccaaa ggccatttag gtcagtctcc tgtttggaaag 120  
 ttccaggtct atcatatcct gccttatagt ttacaataca cttttgggag attatgtctt 180  
 ttgagtcttt tagtttagtc ctgcctataa aatgagtagg ataagtgtta tcccaggttc 240  
 ataggtatgg agtctcatag atgaggctca gggacggggg tgcctcacc aaggtcacac 300  
 tgccaggagc tcatttttcc tgtgatctgt gatagtttct tttgtcaacc tttttcttct 360  
 20 tctcttctct tgctgcctga ttgtccccag ccattcccagc tcagtagctt ttcctgggat 420  
 aactgtgatg aagggaagga ccctgcggtg atcagaagcc tgactctgga gcctgacccc 480  
 atcgtcgttc ctggaaatgt gaccctcagt gtcgtgggca gcaccagtgt cccctgagt 540  
 tctctcttga aggtgagcct ggggggtgggt ggagaagggg aggtgagagg gtctggccag 600  
 caggggtact ggggcatgta tgcttgggga actgtgaaga atttcagaat cctggattcc 660  
 25 cagagaatag tacaggacat gtagattcag acactcttcc acaggttcat ggaatctcag 720  
 gatcataaga ttgaaaggaa tctctgatgt cagcgccagc aacttctctg tgagggcagg 780  
 agtgacggat accttgacac tggcagaagc gtccctggcct tctctgggcc tgggtggccaa 840  
 ctgctcatta ttatctgaca gctctggttg gccaattttg ttttctgtgt aattataaaa 900  
 ttgatatacc aattagccag taatatatag tcacttttag aaacacaagt ggtcaaaaaa 960  
 30 taaataaaat aggccaaagt tggttaacttc atgcctgtaa ttccacacac cttaggaggc 1020  
 tgaaggtggg tgggatcctt tttgagg 1047

<210> 40  
 35 <211> 1705  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 40  
 40 acagtagatg ccagtgattt caatgcaagt gttagagcca atcaatgggt agtgactacc 60  
 taaagaattt taagactatg gattgagcat gatggctcac ggctgtaat cccagccttt 120  
 ggaaggtgaa ggtgaaagga ttgcttgagg ccaggagtcc cagaccagct tgggcaacaa 180  
 agtgagcccc atctctacaa aaaatacaaa attagctggg tgtggtggca tgtgcctgtc 240  
 tgtgtttccc acctacatgg gaggtgagg caggaggatc gtctgagccc aggagtttga 300  
 45 ggctgcagtg agtgcagtg gccatgatac aaaaaaaaaa aataaagaat tctaagtcta 360  
 tgtatagttc agtgtagggg gaaaattcac atttgattat taatgtctgc catgggcaca 420  
 ataatacact atactcacac atgggcccaca atgttgccat tcctagaaca gactatctct 480  
 aagatctcat ccagttaaaa attctatgat taaaatatat tgctgctttt ttgaagacag 540  
 aagagctggg atgtttgccc tggaatttac acttataacc tttttcaaac ctttgtttta 600  
 50 ttttttttta ccagggtggat ttagtttttg agaaggagggt ggctggcctc tggatcaaga 660  
 tcccatgcac agactacatt ggcagctgta cctttgaaca cttctgtgat gtgcttgaca 720  
 tgtaattcc tactggggag ccctgccag agccctgctg tacctatggg ctcccttgcc 780  
 actgtccctt caaagaagta agtacttagg gagagagag cgttaccctc gtggctaagg 840  
 agatgggggt tggagagaag ggtctttgca ttctcttct gcagatctgc atgtctctgg 900  
 55 atttgtaagc cagtgtgacc tatcaggaat cacttatctt ccgggagcct cagttatcca 960  
 tctacgaaat gggagacttg aacttagatg tgatcttcag ggccctttat ccatataatc 1020  
 catgctctac agtgctatgg ccgtctctca tcttgctgag ctgttttgag aatgggaaga 1080  
 ggggtggtag ttcattggctg caatcctagc agtggctcta ggagaaagac cccatcagta 1140

```

ggctcccact gactggcggt ccactggctt tcccgcaggg aacctactca ctgcccaga 1200
gcgaattcgt tgtgcctgac ctggagctgc ccagttggct caccaccggg aactaccgca 1260
tagagagcgt cctgagcagc agtgggaagc gtctgggctg catcaagatc gctgcctctc 1320
taaagggcat atagcatggc atctgccaca gcagaatgga gcggtgtgag gaaggtccct 1380
5 tttcctctgt tttgtgtttg ccaaggccaa actcccactc tctgcccccc tttaatcccc 1440
tttctacagt gagtccacta ccctcactga aaatcatttt gtaccactta catttttagg 1500
tggggcaagc agccctgacc taaggagaa tgagttggac agttcttgat agcccagggc 1560
atctgctggg ctgaccacgt tactcatccc cgtaaactt ctctctaaag agcctcgctc 1620
atctccaaag cagttaagga atgggaacag agtggttttag gacctgaaga atctttatga 1680
10 ctctctctct tctctctctt ttttt 1705

```

```

<210> 41
<211> 1043
15 <212> ADN
    <213> Homo sapiens

```

```

<400> 41
tttctttgcg taaccaatac tggaaggcat ttaaaggacc tctgccgcct cagaccttgc 60
20 agttaactcc gccctgaccc acccttcccc atgcagtcct tgatgcaggc tcccctcctg 120
atcgccctgg gcttgcctct cgcgacccct gcgcaagccc acctgaaaaa gccatcccag 180
ctcagtagct tttcctggga taactgtgat gaagggaagg accctgcggt gatcagaagc 240
ctgactctgg agcctgaccc catcgctggt cctggaaatg tgacctcag tgcgtgggc 300
agcaccagtg tccccctgag ttctcctctg aaggtggatt tagttttgga gaaggagggtg 360
25 gctggcctct ggatcaagat cccatgcaca gactacattg gcagctgtac ctttgaacac 420
ttctgtgatg tgcttgacat gttaattcct actggggagc cctgcccaga gccctgcgt 480
acctatgggc ttccttgcca ctgtcccttc aaagaaggaa cctactcact gcccagagc 540
gaattcgttg tgcctgacct ggagctgccc agttggctca ccaccgggaa ctaccgcata 600
gagagcgtcc tgagcagcag tggaagcgt ctgggctgca tcaagatcgc tgcctctcta 660
30 aaggcatat agcatggcat ctgccacagc agaatggagc ggtgtgagga aggtcccttt 720
tcctctgttt tgtgtttgcc aaggccaaac tcccactctc tgccccctt taatccccct 780
tctacagtga gtccactacc ctactgaaa atcattttgt accacttaca ttttaggctg 840
gggcaagcag ccctgacctt agggagaatg agttggacag ttcttgatag cccagggcct 900
ctgctgggct gaccacgtta ctcatcccc ttaacattct ctctaaagag cctcggtcat 960
35 ttccaaagca gttaaggaat ggaacagag tgtttttagga cctgaagaat ctttatgact 1020
ctctctcttt ctctcttttt ttt 1043

```

```

<210> 42
40 <211> 342
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

```

```

<400> 42
45 atgacntgya aratgwsnca rytngarmgn aayathgara cnathathaa yacnttycay 60
cartaywsng tnaarytngg ncayccngay acnytnaayc arggngartt yaargarytn 120
gtnmgnaarg -ayytncaraa yttyytnaar aargaraaya araaygaraa rgtgnathgar 180
cayathatgg argayytnga yacnaaygcn gayaarcary tnwsnttyga rgarttyath 240
atgytnatgg cnmgnytnac ntggcnwnsn caygaraara tgcaygargg ngaygarggn 300
50 ccnggncayc aycayaarcc nggnytnngn garggnacnc cn 342

```

```

<210> 43
<211> 4195
55 <212> ADN
    <213> Homo sapiens

```

```

<400> 43

```

|    |             |             |            |             |            |              |      |
|----|-------------|-------------|------------|-------------|------------|--------------|------|
|    | ttccaccttt  | tggctcttgt  | aaataatgct | gctatgaaca  | tgaatgtaca | aacatctgtt   | 60   |
|    | tgaatccctg  | cattcaattc  | ttttgcatat | ataccagga   | gcagaatgat | ggatcatatg   | 120  |
|    | gtaattctgt  | gtttatttat  | ttgaggaaca | aacttgccgt  | ttccataac  | agctgcacta   | 180  |
|    | ttttacattc  | ccactaacag  | tgcattaggc | ttccaattct  | ctatgcctc  | accaacactt   | 240  |
| 5  | gttttctggg  | ttttaaaaga  | agtagtagtc | atccttgtag  | gtgtcaggtg | gtatctcatt   | 300  |
|    | gtcgttttgc  | ttcatgtttt  | cctaaagatt | agtaattttc  | atatgcttat | tgaccatttg   | 360  |
|    | tatatcttct  | tcggagaagt  | gtctatttga | gtctttcccc  | aattttgatt | ggtttgtttg   | 420  |
|    | ttttttgttg  | ttgagttgta  | gggattcttt | tatatcttgg  | atattaatcc | cttatcagat   | 480  |
|    | atttgtttta  | caaataatttt | ctttgtaaca | acagaaacac  | accacagtct | tcaagggttg   | 540  |
| 10 | aagccagtta  | atctgagtag  | cattttgtta | gtgggtggga  | gaggatttgt | tcctcctgaa   | 600  |
|    | atcctgggga  | attggccacc  | tcctcttctc | ctcttaggca  | tgaagcgcgt | ctggcttctc   | 660  |
|    | caaagaactc  | ttccctccca  | ctacctcaga | gttagcttcc  | tctcttcagc | cagtgatcct   | 720  |
|    | ggggtcccg   | acacaataat  | taaccaagag | agggtgaaag  | gctccctgct | gtgtttatgc   | 780  |
|    | aatggctcag  | gcccttgtga  | agtgccgagg | gaccccaagc  | agcctccatc | tcccagggca   | 840  |
| 15 | tgggtccatcc | ccagctttca  | cagaacagga | aagctgtgga  | ggagtgtggg | cagcagggta   | 900  |
|    | ggaatggata  | tagcccttgg  | caacaacaca | tttccccaca  | aagcaccac  | ccaaaagaac   | 960  |
|    | aacaacgata  | gttttagttt  | ttagtaatga | gaacaatagt  | tctcatgact | aaaagccatc   | 1020 |
|    | agccaggaca  | ctgttctcaa  | cccttttgcg | gtctttggac  | cctttgaaac | tctgacagaa   | 1080 |
|    | gccatggagg  | aatgttctca  | ctgagtgcac | gcactcaaaa  | tgatgcattc | aacttcaatt   | 1140 |
| 20 | cagtttcagg  | gatgtatggc  | ctgaccacca | atgcagggga  | ttagcaatcg | caatagtggg   | 1200 |
|    | gagggcagtg  | gagtggaat   | ctggctggat | caagcaagt   | gatgccagca | gcccagaaaa   | 1260 |
|    | agagccccc   | tacctgcttt  | ttccttctct | ggcactattg  | cccagcaaat | gccttctctc   | 1320 |
|    | ttccgcttct  | cctacctccc  | cacccaaaat | tttcattctg  | cacagtgtat | gccacattca   | 1380 |
|    | ctggttgaga  | aacagagact  | gtagcaactc | tggcagggag  | aagctgtctc | tgatggcctg   | 1440 |
| 25 | aagctgtggg  | cagctggcca  | agcctaaccg | ctataaaaag  | gagctgcctc | tcagccctgc   | 1500 |
|    | atgtctcttg  | tcagctgtct  | ttcagaagac | ctggttaagt  | ggactgtctg | ggttggcccc   | 1560 |
|    | gcactttggg  | cttctcttgg  | ggagggtcag | ggaagtggag  | cagccttctc | gagagaggag   | 1620 |
|    | agagaaagct  | cagggaggtc  | tggagcaaa  | atactcctgg  | aggtggggag | tgaggcaggg   | 1680 |
|    | ataaggaaag  | agagtatcct  | ccagcacctt | ccagtgggta  | agggcacatt | gtctcctagg   | 1740 |
| 30 | ctggactttt  | cttgagcaga  | gggtgggggt | gttaaggaa   | tctacggggc | cccgtgtgtg   | 1800 |
|    | tgcacatgtc  | tctgtgtgaa  | tggaccttct | cccttccac   | acgtgtatcc | ctatcatccc   | 1860 |
|    | acccttccca  | ccagaggcca  | tagccatctg | ctggtttggg  | tatttgagag | tgcaggccag   | 1920 |
|    | gacaaggcca  | tcgcttgggg  | catgaatcct | ctgcgtactg  | ccctggccag | atgcaaatcc   | 1980 |
|    | cctgccatgg  | gattccccag  | aaggttctgt | ttttcagggt  | gggcaagttc | cgtgggcatc   | 2040 |
| 35 | atgttgaccg  | agctggagaa  | agccttgaac | tctatcatcg  | acgtctacca | caagtactcc   | 2100 |
|    | ctgataaagg  | ggaatttcca  | tgcctgtctc | agggatgacc  | tgaagaaatt | gctagagacc   | 2160 |
|    | gagtgctctc  | agtatatcag  | ggtgaggagg | ggctgggtgt  | ggcgggggct | ctctgcctgg   | 2220 |
|    | tcttggggct  | gccctggggc  | agcgggtctc | cctgccaccc  | ttcatagatg | ctatgcctcg   | 2280 |
|    | gctctctctg  | agatctttaa  | actctggctt | cttctctctc  | aatcttgaca | gaaaaagggg   | 2340 |
| 40 | gcagacgtct  | ggttcaaaga  | gttgatatac | aacactgatg  | gtgcagttaa | cttccaggag   | 2400 |
|    | ttcctcattc  | tgggtgataaa | gatgggcgtg | gcagcccaca  | aaaaaagcca | tgaagaaagc   | 2460 |
|    | cacaaagagt  | agctgagtta  | ctggggccag | aggctggggc  | cctggacatg | tacctgcaga   | 2520 |
|    | ataataaagt  | catcaatacc  | tcatgcctct | ctcttatgct  | tttgtggaat | gaggttctct   | 2580 |
|    | ggtgtggagg  | gaggggttga  | aaacccaaa  | gaagaaaaag  | aaatctatgt | tatcccaccc   | 2640 |
| 45 | tacctctcac  | aagcctttcc  | tgctttaccc | ctcacctggc  | ctctgcccc  | cattccttca   | 2700 |
|    | gcccctcatt  | tcgagcattg  | gatttgaggc | ttaaggattc  | aaaaagtcgt | catgaatata   | 2760 |
|    | gctgatgatt  | ttatagtggg  | tctgaaatgg | gtcggggatt  | tgggaacagg | gtggtagtat   | 2820 |
|    | aagaacaact  | gatactgttc  | tctaagctaa | atcttagctt  | ccagctacct | gtcttagatg   | 2880 |
|    | tggctcttgg  | gaaccttaga  | gtgatagcta | catagaagt   | tgtgggtgtg | tgtgtgtgtg   | 2940 |
| 50 | tctgtgtgtg  | tgtgtgtgag  | agagagacag | acagaaagag  | agcaagagag | ggaagggggg   | 3000 |
|    | agaggctgat  | tgtgtgtgtg  | gtgtgatgta | ggtggacaat  | gttcagagtc | ctccattaac   | 3060 |
|    | aggataatcc  | tcacacctgt  | ccacatacct | cttggttgtc  | cttggggatt | ttgaaaattt   | 3120 |
|    | ttcctccctc  | tccactccca  | aactcccaac | tcaattaaat  | gataaaggaa | taggcacaaata | 3180 |
|    | ggaaaaataa  | ttagtaaaac  | ttaagtcaaa | gaatagggtta | ttcatacgtc | gcctatggga   | 3240 |
| 55 | ttctatgctt  | tgtgatcaga  | aaattatcta | aaaaataact  | cccaagggct | ggtacaaggg   | 3300 |
|    | aggccagaag  | acgagtgggt  | cttctctgag | gtggacatta  | aaaaaagaag | aaaatgaagg   | 3360 |
|    | ggaacctttt  | gacaagaatg  | tcaccccaaa | ctggattttc  | atgctgtggg | gtgggggaatt  | 3420 |
|    | ttctgttgtc  | ctcacttagg  | tgtgtgggga | gtgggtgttag | tgatgggtaa | aaaggtagga   | 3480 |

```

agctgtcaca gaatcactaa accagggttc ttaacttgtc tgtctataca tctctgaaat 3540
tggtgtgaag ttgtgtgcat cattttgagt gacgcactga gaacattcct ccacggcttc 3600
catcgagagt ctcgaaaagg cccaacacct caaaaagggtt aagaacactt gtctgtctta 3660
ctggttttta gtaacaaatg gcagagtatt tctctctgtc tctctctctt tttttttttt 3720
5 tttttttgag acacagggtc ttgtctgtca cgtggactag agtacaatgg gcatgatcat 3780
gggtcactg tagcctcgaa cacctgggct caagtaatcc tcccacctca gcctctttag 3840
tagctgggac tacagcatga gccactgccc ttggctaatt tttaaattat tttttgtag 3900
agatggaaac ttgctatgtt gcccaggcta gtctcaaact cctggactca agcgatcctc 3960
ctacctggc ctcccaaagt gctgagatta cagtgtgac caccacacac ctggccaaag 4020
10 attggagtat ttttattgct attgttgtgc tgggtgggtg ggtgggtgta tgctttgtgg 4080
ggacgtgtgt tgttgccaag ggctaaatca gtctctaccc tgctgccac agtcctccac 4140
agctttcctg ctctgtgaag ctaaggatac accccgatga taagctgtca acata 4195

15 <210> 44
    <211> 477
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

20 <400> 44
    tttttttttt ttttttttgg ataaagactt atttattatt tatcttatca tttcccagaa 60
    caaaggccat tgagtaagcc attcccttta aacttggttg ggcagctgtc acatggctga 120
    cctcttaatt acttcccaca gcctttgcca tgactgtggc catgcccacg tgggtgtgtc 180
    tcatgcagct tctcatgaca ggcaaagatc aactttgcca tcagcatcat acactcctca 240
25 aagctcagct gattgtcctg gtgtgtgtcc aggtcctcca tgatgtcatt tatgagggct 300
    tcatttctct tctctttctt cataaaagggt tgccaaactg tgctcccccac catttggtct 360
    gaattccttc ttgctcaggg tgtaggggng ggtcttcctt cttaaagtat tgatgaaagg 420
    gggccagatg ggggggttat gctgcgctcc atctgaaaag tggctttggt gggccat 477

30 <210> 45
    <211> 406
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

35 <400> 45
    tttttttttt tttttttttt ttttggagga agagacttta tttggcccca gcccttagcc 60
    ccacagccaa gacagtttga cataacaggc cccggggccc tggttgggta gaggcaggg 120
    ggcctggcct cctgattagt ggctgtggcc gtggccacca tgactgtggc cgtggccggg 180
40 gccactgtga tcttggccac tgtgggtctta ggggtgccc tcccagaggc ctggcttatg 240
    gtgggtggcca gggccctcgt caccctcgtg cattttttcg tgggagggcc aggttagcct 300
    cgccatcagc atgatgaact cctggagctc agctgcttgt ctgcatttgg gtccaggtcc 360
    tccatgatgt gttctatgac cttttcattc ttattctcct tcttga 406

45 <210> 46
    <211> 425..
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

50 <400> 46
    ggaggaagag actttatttg gccccagccc ctatccccac agccaagaca gtttgacata 60
    acaggccccc gggcccttgt tgggtaaagg cagggtggcc tggcctcctg attagtggct 120
    gtggccgtgg ccaccatgac tgtggccgtg gccgtggcca ctgtgatctt ggccactgtg 180
55 gtcttagggg gtgccctccc cgaggcctgg ctatgggtgg tggccagggc cctcgtcacc 240
    ctcgtgcac ttctcgtggg agggccagggt tagcctcgcc atcagcatga tgaactcctc 300
    gaagctcagc tgcttgtctg catttgtgtc caggtectcc atgatgtgt ctatgacctt 360
    ttcattctta ttctccttct tgagaaaatt ttgcagatct tttcgacca gctcttngaa 420

```

ttccc 425

<210> 47  
 5 <211> 565  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 47  
 10 aattcgctcg gctttgacag agtgcaagac gatgacttgc aaaatgtcgc agctggaacg 60  
 caacatagag accatcatca acaccttcca ccaatactct gtgaagctgg ggcacccaga 120  
 caccctgaac cagggggaat tcaaagagct ggtgcgaaaa gatctgcaaa attttctcaa 180  
 gaaggagaat aagaatgaaa aggtcataga acacatcatg gaggacctgg acacaaatgc 240  
 agacaagcag ctgagcttcg aggagtcat catgctgatg gcgaggctaa cctgggcctc 300  
 15 ccacgagaag atgcacgagg gtgacgaggg ccctggccac caccataagc caggcctcgg 360  
 ggagggcacc ccctaagacc acagtggcca agatcacagt ggccacggcc atggccacag 420  
 tcatggtggc cacggccaca ggccactaat caggaggcca ggccaccctg cctctacca 480  
 accagggccc cggggcctgt tatgtcaaac tgtcttggct gtggggctag gggctggggc 540  
 caaataaagt ctcttctctc aagct 565

20

<210> 48  
 <211> 430  
 <212> ADN  
 25 <213> Homo sapiens

<400> 48  
 gacttggagg aagagacttt atttggcccc agcccctagc cccacagcca agacagtttg 60  
 acataacagg ccccgggggc ctggttgggt agaggcaggg tggcctggcc tcctgattag 120  
 30 tggctgtggc cgtggccacc atgactgtgg ccgtggccgt ggccactgtg atcttggcca 180  
 ctgtggtctt agggggtgcc ctccccgagg cctggcttat ggtggtggcc agggccctcg 240  
 tcaccctcgt gcatcttctc gtgggaggcc caggtttagc tcgccatcag catgatgaac 300  
 tcctcgaagc tcagctgctt gtctgcattt gtgtccaggt cctccatgat gtgttctatg 360  
 accttttcat tcttattctc cttcttgaga aaattttgca gatcttttctg caccagctct 420  
 35 ttgaattccc 430

<210> 49  
 <211> 305  
 40 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 49  
 45 tgacttggag gaaaaaactt tatttggccc cagcccctag cccacagcc aaaacagttt 60  
 gacataacag gccccggggc cctggttggg tagaggcagg ggggcctggc ctctgatta 120  
 gtggtgtggc ccggggccac catgactgtg gccggggccg gggccactgt gatcttgcca 180  
 ctggggtctt agggggtgcc ctccccgagg cctggtttat ggtggtggcc agggcccttg 240  
 tcacccttgt gcatttttct gtgggaggcc caggtttagc tcgccatcag catgatgaac 300  
 50 tcctc 305

<210> 50  
 <211> 452  
 <212> ADN  
 55 <213> Homo sapiens

<400> 50  
 ggaggaagag actttatttg gccccagccc ctagcccccac agccaagaca gtttgacata 60

acaggccccg gggccctggt tgggtagagg cagggtggcc tggcctcctg attagtggct 120  
 gtggccgtgg ccaccatgac tgtggccgtg gccgtggcca ctgtgatctt ggccactgtg 180  
 gtcttagggg gtgccctccc cgaggcctgg cttatggtgg tggccagggc cctcgtcacc 240  
 ctcgtgcatt ttctcgtggg agggccagggt tagcctcgcc atcagcatga tgaactcctc 300  
 5 gaagctcagc tgcttgtctg catttgtgtc caggtcctcc atgatgtgtt ctatgacctt 360  
 ttcattctta ttctccttct tgagaaaatt ttgcagatct tttcgacca gctctttgaa 420  
 tccccctggg ttcaggggtgt ctgggtgccc ca 452

10 <210> 51  
 <211> 4439  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 51  
 atcactgtgg agtaggggaa gggcactcct ggggtggcaa ggtgggaggt gggccctgtg 60  
 tccccacagt gggcagggag gtagtgaaag ggaagctggc cggacaggaa gggccattcc 120  
 aagagggctt tgtgcgcagg gctaagccaa gctttctcca taggcaatgg ggagcaactg 180  
 gaggttcgta gcaggagaag gacacatcaa gcccaccagg aggctaagta aaaacagttg 240  
 20 tctcccaagt tataagttcc tggaaacctt gctgggagca ggatttagaa aaatgatgtc 300  
 gagagatgct agaaacatat tcgccctgag gctctctcac tcagactgca agaggaagt 360  
 atcatcagaa ttgcccttaa ccaggaacca gaatagctgg gtccccctcc tgccaagtca 420  
 gcaaccagct atgtgacctt gctcaggctcc atctccgggt gtcagtttct tcatctacaa 480  
 tgcaagaggg ttgcccacct ctgagaacct ttctaaccct aaatctcacc ctatgaatct 540  
 25 aagaacacaa cccctcgcca tcctaagtat cacagagcca ggcaagcatg ggtgagagct 600  
 cagaccatcc ttgttggact aaaaggaagg ggcagactgc catggggggc agccgagagg 660  
 gtcaggcccc cataggtcct cagcctgctt caacctcaaa ggggatgggg ggctgagtgg 720  
 tgccagagga gcagcaggct cgctcgggga gtaggggcc ttaggataga agggaaatga 780  
 actaaacaa cagcttcctg caaaccagtt tcaggccagg gctgggaatt tcacaaaaaa 840  
 30 gcagaaggcg ctctgtgaac atttctgcc ccgccccagc ccccttctg gcagcattag 900  
 cacactgtct acctgtgaag caatcttccg gagacagggc caaagggcaa gtgccccagt 960  
 caggagctgc ctataaatgc cgagcctgca cagctctggc aaacactctg tgtggctcct 1020  
 cggctttggt aagtgaagct ccagcttccc caggcagaag cctgcctgcc gattccttct 1080  
 ttcttccctt gacccaactt ccttccaaat cctcctccta gaagccctcc ttggttggcc 1140  
 35 ctgcctactt taaagcttct ttacatttt cttaggtcat gttccctgg ggccctcgc 1200  
 cctcaaatgc tttgcttttt ggcactctgt agatattcta aaaaatcatt ttgtacatgt 1260  
 gtgtgacagg ccatctccca gttaagttgc agcctgtgct ttctttttat ttgcacttc 1320  
 cccactatt tctgtgagt cttagtagga agtgtcaaag aagcttgaca gcattttctt 1380  
 ctaagtgtcc caactcttgg ttttccatta cacagacaga gtgcaagacg atgacttgca 1440  
 40 aaatgtcgca gctggaacgc aacatagaga ccatcatcaa caccttccac caatactctg 1500  
 tgaagctggg gcacccagac accctgaacc agggggaatt caaagagctg gtgcaaaaag 1560  
 atctgcaaaa ttttctcaag gtagggctgg actctggcag gtctgaccca gcctcaccgc 1620  
 agtttgggtt gacaaggag gatgggagta tgggctacag caatcaagg gaagatttga 1680  
 gctcctggag cccagcccca agacgcagcg agtgtcctgt tatacagggc aggtgctcac 1740  
 45 agttacacag gacgacagg tcaagaaatt gctcaattga acacctgcta tttgtcgggc 1800  
 cctgttctgg gcagagggat gtagtggtaa atgggagccc actattccat gaggagacac 1860  
 acagtaaagt tgttgcccaa taaagagcac agataaagcc aaatgccaat aagtgcctgg 1920  
 aagaaaatga gatagagtgc gctgtgggca atggggctgg gtgggggtgga ggtgaccagt 1980  
 tagggtacat gagaagggcc tctttgagga ggtaacattt gagctgagcc ccgaatgttg 2040  
 50 gggaggggaag cccctgagga tgacatttg cacaagctg agggagacct aagcctcagg 2100  
 gcgaacttgg ggtggaagac ttgggggctt ttctaactct aagggtctgc ggtggaataa 2160  
 gaatgcataa agagcacatg gagagcacct gcacagcact cagggaactg ggaggttttt 2220  
 cccccgctcc aaaaatgatt aggcagttct aagaaaaagg ctgagcactt ccaacagcct 2280  
 ttttgttttc ttttcaaatt tggggaaagt cgggaaacag aggcctgcat taagaagggt 2340  
 55 ggaacacatg ggtctcagtc tcagttccag tcccggagcc agacatcctg gggtaggtcc 2400  
 ccagccctcc cagtgccctt cctccgcct tggttaagggt gagaattgca gccttcagag 2460  
 ttaggggccc tgacagctct ccataggtgg aggcctcagg caggcaggat gctgggtggg 2520  
 gtaggcaaga aagggccag cagagaggcc gcatcggaat actatcctcc atgtgacccc 2580

ctatgcccg c ttcaccccc acctgacatc ccccaccaga agcaaagcga tgctgtggga 2640  
 aaggaagcag agcctcatgg atgggctgca caggagagtg ctgcattgg ctgggtaccc 2700  
 cacaggttct gggaggggac ttagcgaggt gactcagtgc ctggcctcc caaagtgtcg 2760  
 5 ggattacaag catgagccac cctgtccgac catctcccct tttatacttt atcacaccct 2820  
 tgaggtcagc ggagcacata ctctgtcttc tgaccctcca tctcccctgc ccacacctag 2880  
 gtttttctag tgtttccccg ttgtattggg tgaaataagt ttcactaatt ggtaacctcc 2940  
 agaggggaagg gaaggagggg caggggaagg agtgaagtgc agaggggtag cagagtggaa 3000  
 ctggcctcta agtcagatct gaatttgcac gccctcaata gtcaagcctg tgaaaactaa 3060  
 tgaccctctc taggactggg ttcaagtctt cctccaggaa gataccattc ctagtgtta 3120  
 10 aagttgttat aaggaccaa tgaggtgaca tttccaggct tactcatgcc atgaccaggg 3180  
 caagaccctg gaactcagct tctcttcta taaatagaga atcagcacc aagtcacagg 3240  
 gtcattggagg gaataaactg gagagcgttt ggtatgtgct cagtgtctgc tccattgtgc 3300  
 gcactcagcc tatggtcatt ttaattttt aaatccagcc ccagggtcga ggcttccttg 3360  
 15 ctacacagcct tctctcccca ccgcagaag gagaataaga atgaaaagg catagaacac 3480  
 atcatggagg acctggacac aaatgcagac aagcagctga gcttcgagga gttcatcatg 3540  
 ctgatggcga ggctaacctg ggctccccc gagaaagtgc acgagggtag cgagggcct 3600  
 ggccaccacc ataagccagg cctcggggag ggcacccct aagaccacag tggccaagat 3660  
 cacagtggcc acggccacgg ccacagtcac ggtggccacg gccacaggcc actaatcagg 3720  
 20 agggcaggcc accctgcctc taccacaacca gggccccggg gctgttatgt caaactgtct 3780  
 tggctgtggg gctaggggct ggggcaaata agtctcttc tccaagtcag tgctctgtgt 3840  
 gcttcttcca cctcttctcc aacctgcct tcccagggt ctggcattta gacagccctg 3900  
 tcttatctg tgactcagcc cctcattca gtattaacaa aatgagaagc agcaaacatg 3960  
 gggctgtgac tgggccccct ggctcacctc cctgaccatg tctcacctc tgacttcagg 4020  
 25 cccactgtt cagatcccag gctcctgccc ccattctaga caccctgtcc agcctgtcca 4080  
 gcctgacaaa tggcccttgt cactgtacac tgtagaaagc aaaaaggcat atctctaccc 4140  
 cttgatatgc ctgtacctc accaaccagc cccaagcctg tcttcaccca tactgtcta 4200  
 cacagccctc tctctctcct aacagaattc tattcctctg aaagtcttca gaaactggac 4260  
 ctagatagtg ccattgtctg ggaggaatat ggcaccaggc agtggaaaca aggacagatc 4320  
 30 ggtgtgttat ctcacatttg atcagagagc atgatctctc ttaacagacc tgccacccta 4380  
 atcaacggga gtgctcacac aagtgggagt ctgagagctt agccctatgc ccacctgg 4439

<210> 52

35 <211> 565

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 52

40 aattcgctcg gctttgacag agtgcaagac gatgacttgc aaaatgtcgc agctggaacg 60  
 caacatagag accatcatca acaccttcca ccaatactct gtgaagctgg ggcacccaga 120  
 caccctgaac cagggggaat tcaaagagct ggtgcgaaaa gatctgcaaa attttctcaa 180  
 gaaggagaat aagaatgaaa aggtcataga acacatcatg gaggacctgg acacaaatgc 240  
 45 agacaagcag ctgagcttcg aggagtcat catgctgatg gcgaggctaa cctgggcctc 300  
 ccacgagaag atgcacgagg gtgacgagg ccctggccac caccataagc caggcctcgg 360  
 ggagggcacc ccctaagacc acagtggcca agatcacagt ggccacggcc atggccacag 420  
 tcatggtggc cacggccaca ggccactaat caggaggcca ggccaccctg cctctaccca 480  
 accagggccc cggggcctgt tatgtcaaac tgtcttggt gtggggctag gggctggggc 540  
 50 caaataaagt ctcttctctc aagct 565

<210> 53

<211> 255

<212> ADN

55 <213> Homo sapiens

<400> 53

gayaayggng aygtntgyca rgaytgyath caratggttna cngayathca racngcngtn 60



mgnacnaayw snacnttygt ncargcnnytn gtngarcayg tnaargarga rtgygaymgn 120  
 ytnngnccng gnatggcnga yathtgyaar aaytayathw sncartayws ngarathgcn 180  
 athcaratga tgatgcayat gcargaycar carccnaarg arathtgygc nytnngtnngn 240  
 ttytgygayg argtn 255

5  
 <210> 54  
 <211> 2724  
 <212> ADN  
 10 <213> Homo sapiens

<400> 54  
 cgcgctatgt acgccctctt cctcctggcc agcctcctgg gcgcggctct agccggcccg 60  
 gtccttggac tgaaagaatg caccaggggc tcggcagtggt ggtgccagaa tgtgaagacg 120  
 15 gcgtccgact gcggggcagt gaagcactgc ctgcagaccg tttggaacaa gccaacagtg 180  
 aaatcccttc cctgcgacat atgcaaagac gttgtcaccg cagctgggtga tatgctgaag 240  
 gacaatgccca ctgaggagga gatccttggt tacttgagga agacctgtga ctggcttccg 300  
 aaaccgaaca tgtctgcttc atgcaaggag atagtggact cctacctccc tgctacctcg 360  
 gacatcatta aaggagaaat gagccgtcct ggggaggtgt gctctgctct caacctctgc 420  
 20 gagtctctcc agaagcacct agcagagctg aatcaccaga agcagctgga gtccaataag 480  
 atcccagagc tggacatgac tgaggtgggtg gcccccttca tggccaacat cctctctctc 540  
 ctctaccctc aggcagggccc ccgcagcaag cccagccaa aggataatgg ggacgtttgc 600  
 caggactgca ttcagatggt gactgacatc cagactgctg tacggaccaa ctccaccttt 660  
 gtccaggcct tgggtggaaca tgtcaaggag gagtgtgacc gcctgggccc tggcatggcc 720  
 25 gacatatgca agaactatat cagccagtat tctgaaattg ctatccagat gatgatgcac 780  
 atgcaaccca aggagatctg tgcgctgggt ggggtctgtg atgaggtgaa agagatgccc 840  
 atgcagactc tgggtccccgc caaagtggcc tccaagaatg tcatccctgc cctggaactg 900  
 gtggagccca ttaagaagca cgaggtccca gcaaagtctg atgtttactg tgaggtgtgt 960  
 gaattctctg tgaaggaggt gaccaagata attgacaaca acaagactga gaaagaaata 1020  
 30 ctcgacgctt ttgacaaaat gtgctcgaag ctgcccgaag cctgtcggga agagtggcag 1080  
 gaggtgggtg acacgtacgg cagctccatc ctgtccatcc tgctggagga ggtcagccct 1140  
 gagctgggtg gcagcatgct gcacctctgc tctggcacgc ggctgcctgc actgaccgtt 1200  
 cacgtgactc agccaaagga cgggtggcttc tgcgaagtgt gcaagaagct ggtgggttat 1260  
 ttggatcgca acctggagaa aaacagcacc aagcaggaga tcctggctgc tcttgagaaa 1320  
 35 ggctgcagct tcctgccaga cccttaccag aagcagtggt atcagtttgt ggcagagtac 1380  
 agcccctgct tgatcgagat cctgggtggag gtgatggatc ctctcttctg gtgcttgaaa 1440  
 attggagctt gcccctcggc ccataagccc ctggtgggaa ctgagaagtg tatatggggc 1500  
 ccaagctact ggtgccagaa cacagagaca gcagcccagt gcaatgctgt cgagcattgc 1560  
 aaacgccatg tgtggaacta ggaggaggaa tattccatct tggcagaaac cacagcattg 1620  
 40 gtttttttct acttgttgtt ctgggggaat gaacgcacag atctgtttga ctttgttata 1680  
 aaaatagggc tccccacact ccccatcttc tgtgtccttt attgtagcat tgctgtctgc 1740  
 aaggggagccc ctagcccctg gcagacatag ctgcttcagt gccccctttc tctctgctag 1800  
 atggatgttg atgcactgga ggtcttttag cctgcccttg catggcgccct gctggaggag 1860  
 gagagagctc tgctggcatg agccacagtt tcttgactgg aggccatcaa cctcttggt 1920  
 45 tgaggccttg ttctgagccc tgacatgtgc ttgggactg gtgggcctgg gcttctgagg 1980  
 tggcctcctg ccctgatcag ggacctccc cgctttcctg ggccctctcag ttgaaccaa 2040  
 gcagcaaaac aaaggcagtt ttatatgaaa gattagaagc ctggaataat caggcttttt 2100  
 aaatgatgta attccactg taatagcata gggatttttg aagcagctgc tgggtggctg 2160  
 ggacatcagt ggggccaagg gttctctgtc cctgggtcaa ctgtgatttg gctttcccg 2220  
 50 gtctttcctg gtgatgcctt gtttggggtt ctgtgggttt ggggtgggaa agggcccatc 2280  
 tgcctgaatg taacctgcta gctctccgaa gccctgcggg cctggcttgt gtgagcgtgt 2340  
 ggacagtggt ggcgcgctg tgcctgctg tgattgcctac atgtccctgg ctgttgaggc 2400  
 gctgcttcag cctgcacccc tccctttgtc tcatagatgc tccctttgac cttttcaaat 2460  
 aaatatggat ggcaagctcc taggcctctg ctctctggta gagggcggca tggcgaaggg 2520  
 55 tctgctgggt gtggattgga tgctggggtg tgggggttg aagctgtctg tggccactt 2580  
 gggcaccac gcttctgtcc acttctggtt gccaggagac agcaagcaa gccagcagga 2640  
 catgaagtgt ctattaaatt gacttcgtga tttttgttt gcactaaagt ttctgtgatt 2700  
 taacaataaa attctgttag ccag 2724

<210> 55  
 <211> 2171  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 55  
 10 cgcgctatgt acgccctctt cctcctggcc agcctcctgg gcgcggctct agccggcccc 60  
 gtccttggac tgaaagaatg caccaggggc tcggcagtgt ggtgccagaa tgtgaagacg 120  
 gcgtccgact gcggggcagt gaagcactgc ctgcagaccg tttggaacaa gccaacagtg 180  
 aaatcccttc cctgcgacat atgcaaagac gttgtcaccg cagctggtga tatgctgaag 240  
 gacaatgcca ctgaggagga gatccttggt tacttggaga agacctgtga ctggcttccg 300  
 aaaccgaaca tgtctgcttc atgcaaggag atagtggact cctacctccc tgctacctg 360  
 15 gacatcatta aaggagaaat gagccgtcct ggggagggtg gctctgctct caacctctgc 420  
 gagtctctcc agaagcacct agcagagctg aatcaccaga agcagctgga gtccaataag 480  
 atcccagagc tggacatgac tgagggtggtg gcccccttca tggccaacat ccctctcttc 540  
 ctctaccctc aggacggccc ccgcagcaag cccagccaa aggataatgg ggacgtttgc 600  
 caggactgca ttcagatggt gactgacatc cagactgctg tacggaccaaa ctccaccttt 660  
 20 gtccaggcct tgggtgaaca tgtcaaggag gagtgtgacc gcctgggccc tggcatggcc 720  
 gatcatatga agaactatat cagccagtat tctgaaattg ctatccagat gatgatgac 780  
 atgcaaccca aggagatctg tgcgctggtt ggggtctgtg atgagggtga agacctgccc 840  
 atgcagactc tgggtccccg caaagtggcc tccaagaatg tcatccctgc cctggaactg 900  
 gtggagccca ttaagaagca cgaggcccc gcaaagtctg atgtttactg tgagggtgtg 960  
 25 gaattcctgg tgaaggagggt gaccaagctg attgacaaca acaagactga gaaagaaata 1020  
 ctcgacgctt ttgacaaaat gtgctcgaag ctgccgaagt ccctgtcgga agagtgccag 1080  
 gaggtggtgg acacgtacgg cagctccatc ctgtccatcc tgctggagga ggtcagccct 1140  
 gagctggtgt gcagcatgct gcacctctgc tctggcacgc ggctgcctgc actgaccgtt 1200  
 cacgtgactc agccaaagga cgggtggctt tgcgaagtgt gcaagaagct ggtgggttat 1260  
 30 ttggatcgca acctggagaa aaacagcacc aagcaggaga tcctggctgc tcttgagaaa 1320  
 ggctgcagct tcctgccaga cccttaccag aagcagtgtg atcagtttgt ggcagagtac 1380  
 gagcccgtgc tgatcgagat cctggtggag gtgatggatc ctctctctgt gtgcttgaaa 1440  
 attggagcct gcccctcggc ccataagccc ttgttgggaa ctgagaagtg tatatggggc 1500  
 ccaagctact ggtgccagaa cacagagaca gcagcccagt gcaatgctgt cgagcattgc 1560  
 35 aaacgccatg tgtggaacta ggaggaggaa tattccatct tggcagaaac cacagcattg 1620  
 gtttttttct acttggtgtg ctgggggaat gaacgcacag atctgtttga ctttgttata 1680  
 aaaatagggc tccccacct ccccatttc ttgtctctt attgtagcat tgctgtctgc 1740  
 aaggagagccc ctagcccctg gcagacatag ctgcttcagt gccccttttc tctctgctag 1800  
 atggatgttg atgcactgga ggtcttttag cctgcccttg catggcgctt gctggaggag 1860  
 40 gagagagctc tgctggcatg agccacagtt tcttgactgg aggccatcaa ccctcttggg 1920  
 tgaggccttg ttctgagccc tgacatgtgc ttgggcaactg gtgggcctgg gcttctgagg 1980  
 tggcctcctg ccctgatcag ggaccctccc cgctttcctg ggcctctcag ttgaacccaa 2040  
 gcagcaaaac aaaggcagtt ttatatgaaa gattagaagc ctggaataat caggcttttt 2100  
 45 aaatgatgta attcccactg taatagcata gggattttgg aagcagctgc tgggtggctg 2160  
 ggacatcagt g 2171

<210> 56  
 <211> 35465  
 50 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 56  
 55 gatcttggct cactgcaacc tccgcctcca aggttcaagc gatcctccca cctcagcctc 60  
 ccaagtagct gggattacaa gcgtgtgcta tcacacctgg ctaattttta tatttttggg 120  
 agagatgggg tttcaccttg ttggttaggc tgggtctgaa ctctgacct caggtgatct 180  
 gcctgcctca gcctcccaaa gtgctgggat tacagggtgtg agccaccgcg cccagcctga 240  
 ccctttcttt ctctactggc aaaactcctg ctctttttta aagccaagct catgtcacct 300

cctctgtgaa gtccctcgctg actccccaag cggtcagtgt ctctctcgta tgggctcccc 360  
 ggcccttgca ctgctctcca tcacaccctg accactctgg gcagtggccc cctcccccac 420  
 ccactgacta tgggctcctt gaaggcaggg cctgggtctg ccccatctct gtgtccccag 480  
 caatgctggg catgagtcag cctcagaaga catctgctga atggctgcaa accagaggaa 540  
 5 atctctccag cctcaggctg ggacccctcc cctctctcct cccacctctg acttcatacc 600  
 actcaccctc cagagtcttc aatgcccact attacttcac acagtggcc tgtgacaggc 660  
 aatcagggtca tegtccacgg ctaccagggtg tttcatgtct actgtgactt ccaggaccac 720  
 aagccctttt ggcgccacca tgtcttcacc taagagatct tcaaagccca gtatgtctct 780  
 ggcacccagt ggatcctcca tgccactgc ggatcccaag cctcctgcct ccttgaagtc 840  
 10 caccaaatca gcaacaccca acagatcctt agtgcccacc aaaccagcga catcccgtaa 900  
 ctcaatcatg agcccaagca gttccaagtc caccaaatcg accagtacaa aaagagcccc 960  
 ttctaaccgg cccagcagca ggtcccgagt ccgcagcaaa gcaagaacac ccagcagggt 1020  
 gagcaccgac accaggacca gcaaagccagc caaggccagc gacgtgagat gccaccagcg 1080  
 gaggggcaca cacagccggg gtaggacacc tggcagaagg ggaagccgca gctccaagag 1140  
 15 gtcacccagc agggccagca ctctggcag gataagaact catggtgcca gaccaggcat 1200  
 ggccagcagg gtgagaactc ccacttcaca gcaaaaaggg agccggggaa agagttacgg 1260  
 ccggcctaga accagcaaca gggaaaggag tgacagccag cctagaaatc tgagcaagaa 1320  
 gagttaccgc ccaccaggag gctcaggtat agggaggagt tccgagctgg ctgtaactcc 1380  
 cagtacagcc aagtgtcaaa ccccgactgg aattccctcc aaggagaaga gtgacaacct 1440  
 20 atctccatcc tcatcaagga aggtgaagag ctacggtcag atgatcatcc ccagtaggga 1500  
 aaagagttac agccccactg aaatgtccag cagggtcaag agttataacc aggcagcac 1560  
 ccgcagcagg ccgcaaagtc acagccaatc tagaagcccc agaaggtcaa gaagtggcag 1620  
 tcagaagagg acgcacagca gagtgagaag tcacagttgg aagagaaacc atagcagggc 1680  
 aagaagtgc acccggaagg gaattctgag ccagatggga agacacagcc agtctagaag 1740  
 25 ccacagcaag gggaaaagtc aaaaccaatc tagaaccctc agaagaggaa gaagtcacaa 1800  
 ctggtctaga aaccccagca aggaaagaag tcatagccat tccagaagct ccagcaaaaga 1860  
 gagagatcac aggggatcta gcagccccag gaaggagagt ggtcgcagtc aatcaggaaag 1920  
 ccccaaccaag cagagagatc acagccgatc tagaagtccc aacaaggcga gagatcgagc 1980  
 ccgatctaga agtccctaca aggcgagaga tcgcagccga tctagaagtc ccaacaaggc 2040  
 30 gagagattgc agccgatcta gaagtcccta caaggcgaga gatcgagcc gatctagaag 2100  
 tcccaaccaag gcaagagatc atagccgatc tagaagtccc aacaaggcga gagatcgagc 2160  
 ccgatctaga agccccagca aggaaagaga tcacagccaa cttggaagcc ccagcaaaaga 2220  
 gagagatcac agacgatcta gaagccccag caaggagaga cagtgcagac aatctagaag 2280  
 ctccagcaaa gagagagatc acagacgatc tagaagcccc agcaaggaga gacagcgagc 2340  
 35 acaatctaga agccccaa caaggagaga tcgcagccaa tctagaagcc ccagcgagga 2400  
 gagagagcac agacaatcca gaagccccag caaagagaga gatcgagac gatggagaag 2460  
 cccagcaag gagagagagc gcagacaatc tagaagctcc agcgaggaga gagatcacag 2520  
 ccgatctaga agccccaa agcagagtgg ttacagtcga cctagagcct ccagcaagga 2580  
 gaaagctcat agccgatcta gaacccccag caaagaagga aatcatagcc aatctagaac 2640  
 40 ctctagcaag gagagcgacc ccagtcaatc tacagtcccc agaagtcctc actggaagag 2700  
 atccctact aggacaagca gtctcagtca gaatagaacc cctagcaaga caagcagcca 2760  
 ctcccatca acatttccca gtgggggcca aacctaaagc caggatgaca gtcaagcga 2820  
 cgccaccacc tctaaggcca ccttacctgg ggaaaggtct tcatcatctt cttccaagct 2880  
 ggcgtagccc ccagtctcag ctggctcagc ggtctctgtc atgaccgggg gaggggacag 2940  
 45 gagacaggag cagagcagca gctgagcagc gtccctcccc ggccagctct ccacagccac 3000  
 acctccggcc acaagtctc taatacagga tgttggcagg tagagaggga tgctggatag 3060  
 ggggaaagga aagacctgtg atgattcaat aaatttttac atagcacca tccccaccaa 3120  
 gcccactgt gtgctcactg ctggcatggg gcacagagga cccagctct gtccctgact 3180  
 gtctacaggg tcttgactgc aagccctgcc cctctctagg tctttttttt ttttgagaca 3240  
 50 gagtctctct ctgttgccca ggtggagtg cagtgggtgt atctcagctc actgaacct 3300  
 ccacctccca ggctcaagca attctcctac ctcagcttcc cgagtagctg gaactacaag 3360  
 tgtgcgtct cagccccggc taattttgta tttttagtag agatggggct tcaccatgtt 3420  
 ggccaggctg ggctcgaact cctgacctca ggtgatccac atgcctcaac ctgcgaaagt 3480  
 gctgggatta taggcatgag ccaccgcacc cgtccccctc tctaggtctt aatttccgca 3540  
 55 tgtgggcaac aaggctgcct tctggttctt attcagtggg gtagggagag gtgacactcc 3600  
 aaatattcaa cagtggggac tgggtgtggg accaatcaga actgagagtg gagcgggagc 3660  
 gataccaggc cttaaccctt tagttgctgg accatgggga ggtctggggg tggggaagt 3720  
 ttatggggaa aaaaaaccct caaactgtgt ttttctctca ctctcacact atcacaacaa 3780

|    |             |             |             |             |             |             |      |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
|    | tcatcaacac  | agaattctgt  | gaccaaattgt | gtggggcttt  | ttccccacac  | actacacagc  | 3840 |
|    | agacaacagc  | taggtgtccc  | ctccgattcc  | attccaacgc  | tgtccccaca  | cccagctaata | 3900 |
|    | ttttgtattt  | ttggaagaga  | caggggtttca | ccatgttgcc  | cagagctcaa  | gcaatctgcc  | 3960 |
|    | cacttcagcc  | ctccaaagtg  | ctgggattac  | aggcgtgagc  | caccacaccc  | gactttttta  | 4020 |
| 5  | aaaaaataaa  | aataaggccg  | ggcgcagtga  | cccatgcctg  | taatcccagc  | actttgggag  | 4080 |
|    | gccgaggtgg  | gcagatcacc  | tgagctcagg  | agtttgacac  | cagcctaggc  | aacatggcaa  | 4140 |
|    | acttgtctct  | aaaaaaaaaa  | aaaaaattac  | aaaagttagc  | cgggtgtggtg | gcatgtgctt  | 4200 |
|    | atagtcccag  | ctacctgaga  | ggctgaggca  | ggaggataaa  | ttgagcctgg  | aagggtcaagg | 4260 |
|    | ctgcagttag  | ccgtgacctt  | gccactgcac  | tcaagcctgg  | atgacccatc  | ttacaaaaaa  | 4320 |
| 10 | aaaatttttg  | ctggagctgc  | tcacagaact  | caaggaaatg  | cttacttaga  | tttactgggt  | 4380 |
|    | tattatagag  | gatattgcaa  | agaacaaaga  | tgaagagatg  | tgtagggcaa  | ggtataaggg  | 4440 |
|    | aaggggcagg  | gagcttcacg  | ccctccctgg  | ggtgctaccc  | tacaggaacc  | ctcaggtggg  | 4500 |
|    | tagctatgcg  | gaagctctcc  | aaacccagtc  | ctcttggtgt  | tttacggagg  | ctttaagaca  | 4560 |
|    | gcagcattgg  | gcatggactt  | ctctgaaaag  | tgtcttaaga  | ccaacaatca  | agaaggtggg  | 4620 |
| 15 | gaagattaga  | gtcttgccct  | ggggcaggaa  | tgtggaggga  | ggaggagggtc | agagagattc  | 4680 |
|    | tgtttcttca  | gacctgcccc  | aggcctaagg  | tacacaacat  | tataacaaga  | gactgtaaca  | 4740 |
|    | aaggctgtag  | gagttaccag  | ccaggaactg  | tggatgaaaa  | ccaatatatt  | tatatatata  | 4800 |
|    | ataccacaag  | gggggtccaa  | agtggcagtt  | agggacaggg  | agtacttgtg  | tagcagtgac  | 4860 |
|    | acaccaaccc  | atctggaagt  | attttaatat  | ttaaacaatt  | ggtatggcta  | tactagtttg  | 4920 |
| 20 | tgattatcag  | ccttagttct  | gtatcaattg  | gcaagatagt  | gtctagggtt  | gccacactct  | 4980 |
|    | agctgtgtag  | caccaagcaa  | agaacttaac  | ttctctagcc  | tgtttccctc  | tctggaagaa  | 5040 |
|    | aggggcttcc  | aggccttaac  | tcacgtactc  | cccataacta  | gactgggaat  | tatctccttt  | 5100 |
|    | gtacagatga  | ggaaacagac  | acagaggtga  | taagttagta  | gcccagggtc  | accatctggg  | 5160 |
|    | aagtggatga  | actaggattg  | gaagccagac  | ctttcataaa  | atgatttctc  | agctcaaaag  | 5220 |
| 25 | gtttttctga  | agattcagta  | ggctcactga  | tagaaattgc  | tgggtgtgtg  | ctggtattcc  | 5280 |
|    | atcaagagtg  | gccattacta  | ctcccacccc  | tgcccctcta  | taaactccag  | atgttccaga  | 5340 |
|    | cctctcatct  | ctccctgtgc  | acacaaggcc  | ttttcacatc  | tgtgggtctt  | agtacaccca  | 5400 |
|    | ctgtgtctgt  | caagaatgtc  | ctcctcctcc  | tttttttttt  | tttttttgag  | atggagtctc  | 5460 |
|    | actttgtgtg  | ccaggctgga  | gtacagttagc | gcatctctag  | ctcactgcaa  | cctctaccct  | 5520 |
| 30 | gcatcagcct  | ccctagtagc  | tgggattaca  | ggcagccacc  | accaccatgc  | ccggctaatt  | 5580 |
|    | ttttgggtatt | tttagtagag  | acaggggttc  | attatgtcag  | ccaggctggg  | ctcaaaactcc | 5640 |
|    | tgacctcagg  | tgatccattt  | accttggtct  | cccagagtgc  | tgggattaca  | ggcaagagcc  | 5700 |
|    | accacgcccc  | gccctccttc  | cccctttttg  | gcctggagaa  | ctccttttca  | cccttcaaag  | 5760 |
|    | cccaccacaa  | acataagaac  | ctctatactt  | cttgcccgt   | gaaatactgc  | ctctgccagg  | 5820 |
| 35 | aagcttctgt  | tgacttctct  | ctctccctct  | tcaccaacgg  | accgcccccg  | ccccccacca  | 5880 |
|    | accccaccac  | acacacacac  | cactactgtc  | ttccactgta  | ctccctgaca  | gtagagaaac  | 5940 |
|    | aagcagggcc  | agttgatgca  | gcctcagcta  | tatctcttac  | atgccaaagg  | ccatgcactg  | 6000 |
|    | gggataacaat | ggtggaaaat  | acatgggtccc | ttcaaagtct  | ggatgtcaag  | tttaatgctg  | 6060 |
|    | gggactaaag  | agaaaagctt  | cagattgaaa  | cctggagggtg | gctggggcaa  | aggaccattg  | 6120 |
| 40 | gcatcatttg  | caggggcaact | tcctaagaga  | agcacctaaa  | tcttggtctt  | taaagacaga  | 6180 |
|    | tttcataaatt | ggcagaggag  | aattctaattg | ataccctatt  | gcctacaggg  | ccccatctaa  | 6240 |
|    | tttgggaatt  | ctactttata  | ccaagataag  | attgccagat  | ttagcaaata  | aaaacagaag  | 6300 |
|    | acatccaatt  | aatttttttg  | tttgtttttg  | ggtttttgtt  | gcggagatgg  | tgtctcacta  | 6360 |
|    | tgttgcgaa   | gctgctgtca  | aattcctggc  | tcaaacaatc  | ctcctgcctt  | ggcctccac   | 6420 |
| 45 | ttcccaaagt  | gctgggatta  | caggcatgag  | ctaccacacc  | tggcccttat  | ttatttattt  | 6480 |
|    | atttaatttt  | cttttttggg  | acggagtgtc  | actctgtcgc  | ccagggttga  | gcgcagtagc  | 6540 |
|    | gcgatctcgg  | ctcactgcaa  | cctctgcctc  | ctgggttcaa  | gcgattatcc  | tgccccagcc  | 6600 |
|    | tcccaagtag  | ctgggactac  | aggcgcgtgc  | caccatgccc  | ggcttttttt  | tttttttttt  | 6660 |
|    | tttttttttt  | gagacggagt  | cttgctctgt  | cgcccaggct  | ggagtgcagt  | ggcacgatct  | 6720 |
| 50 | cggtctcactg | caagctccgc  | ctcctgggtt  | cacgccattc  | tcctgcctca  | gccttccgag  | 6780 |
|    | tagctgggac  | tacaggcgcc  | tgccaccacg  | ccgactattt  | ttttgtattt  | ttagtagaga  | 6840 |
|    | tgggggtttca | ccgtgttagc  | caggatgata  | tcgatctcct  | gacctcgtga  | tccaccggcc  | 6900 |
|    | tcggcctccc  | aaagtgtctg  | gattacaggc  | gtgagccacc  | gcgcccagcc  | tacttattta  | 6960 |
|    | tatttttttaa | gagacagggt  | ctcgtctcagt | tgcccagggt  | ggagtgcagt  | aggggtgatct | 7020 |
| 55 | gtaggaaagg  | ggcttccagg  | ccttaactca  | tgtactcccc  | cataaccagg  | ttgggagggtt | 7080 |
|    | agctcactgt  | aacctcaaac  | tcctgtgtct  | aagggtacct  | actagccctt  | aggagagcag  | 7140 |
|    | ctgggactac  | aggtatgcgc  | caccatgccca | ggcttaattt  | ttactttttt  | tttttttttt  | 7200 |
|    | tttttttga   | gagacggggg  | tctcactata  | ttgcccaggc  | tgttcttgaa  | ctcctgggtct | 7260 |

caagcgatcc tcttgccctta gcttcccaaa gtattggtat cactgcaact agcccaaaga 7320  
 attaatatag ctatgttcca tgtgatattt gggacatact tttctaaaag gttgtatctt 7380  
 ttggatataa ttgtttatct gaaattcaaa ttttaactaga cattgtatat tttatacggc 7440  
 aaccacacac ctgggacaat caagacattc cctgaagtta ccaggagaca atgcccataca 7500  
 5 gctacactt tccaagccc acgtcacaca agggcccttc cagagtattc cagacgtcag 7560  
 gtagggccat cccttggttc acaagtccca ctcctaccac gcctatggca gccaaactga 7620  
 aaggcaaaaca cagtgtctgga gacccacaaa tgccctgggc ctatagcagt caattcccaa 7680  
 gatgccccgc gtgaacacaa taggcaccgc ttccaatgct cgagcaaaga gaccagggca 7740  
 aaaccttcca ctacgggaca ataacggcca gtccccacaa ttcgttgtgg cagttcttcc 7800  
 10 caggatgcct taggcctata gcgaccacct tcccagactc cccgtgtgga agcgctccaa 7860  
 gcctccagga cgggtcagcgg cagggtgtggg ataaaaggaa ccggtctcga caaggatctg 7920  
 ggacactctt tcccaggatg caccaggcct acgactagcg gaccgactcc cacagcgctt 7980  
 caagcggtgag cgctcggttc tcccaggatg ccccaggcgg gcacaaacgc gtatggggag 8040  
 aaaaagaagc cctcgggtca ccacggcccc agaccgcccg ctcccgggtg acgggagtcg 8100  
 15 tcgctcccat catgcagcgg ggccgtagcg cccgcttccc ggcatgcctc gcgacccct 8160  
 gcccgggaca ctcaccggcg ccggcgcccc ccgctccggc tctgcggcgg cggctgcacg 8220  
 cccagcctct gcgcctgcgt cgcaagtagg gtaggacagc gcgcaggggg cgtgaagagc 8280  
 ctaggcgct tgccggcgga gacggactag tctgtagcg ctgtgggaag aggggctatg 8340  
 cgcgctggggc cgtgcagcag acccgcgcgg gggcgccgt gctttgcccc tcgctgcctg 8400  
 20 ggtttacttg gtacagccc cgccccaaag gaacaaag ctgaagggtt cgcgcggtcg 8460  
 tgtgcggggc aggaacgcgc cttacaaaac tgggagtcgc tgggggtgga cagcactgag 8520  
 tcggactgga tccctgggccc gaggcctgct tatttgata atcctagcgc gggacaatga 8580  
 aaggcctccc gcaactggaag gactgatttg catattcccc ggaggggctt tactccagag 8640  
 cgcaagtatt agcatatggc gggggcaacc tgagcaaagc gcatgcgcgc agggactgca 8700  
 25 gactgacgcg aagtgggtag ccttgtcttc gtatgggagc agtttgcatc ctgagagagg 8760  
 gcacaggggc caggacccct cccaaccagg ataaagggtt attgatctcc taggtgtcag 8820  
 gcccctatgt ggccgattct gtggtttctg cagtgaacca tactcctgtc ctcacggcac 8880  
 cccagtcgaa ggagatacgc acctaattag acaactacta ccagaagggt cagacctgga 8940  
 gtgaggaaca cagggggctg tgggagccta agaggcgctt gccccggcct ctggttctag 9000  
 30 aaagacttcc agggaggtgg gatccttaag ccaagtacga ataggagcca actagaatgg 9060  
 gaatgggtct ggcagaatga actgcaagcg ccaaggccca gaggccaaaa aaaaaaaaaa 9120  
 aaaaatagaa gcgcattgtt tgattgagga agcaagagca gcttagtatg cctagaacct 9180  
 aactggagac gggaaatggt tctatagacg atgttagagt tcaactatgg ctacattcca 9240  
 gtcttctctg aagtgaattt gtcacattct ggcttaaaac tccccaaaag ggatccctt 9300  
 35 aggaaaaaaa aaaaatccaa aaatctttat catggcctca gggctataca cctggtctgg 9360  
 ccgtgcttat ctttctgacc ccacctactt cctcctccct ccatttctgt ccagctccac 9420  
 cttaccccaa actctttacc agctcggggc tctgctcttg ccgttccctc cgctgaaaa 9480  
 tgcttttccc tctgaccttt gaatacctac tcttgtgtc accattcata tcttggtaca 9540  
 gatgtcaatc tgagaggctt tctctgatct ctccataata gcacttacac atttgactgg 9600  
 40 agttatggat aaatcgggat tggccatgag ttggtggtgg ttgtaactgg catgaagagt 9660  
 acatggggct gggcgcggtg gctcacgccc gtaatcccag cactttggga ggccgaggct 9720  
 ggtgtatcac ctgaggtcag gagcttgaga ccagcctggg caacatggtg aaacctgccc 9780  
 tctattaaaa ctacaaaaat tagccagggg ttatgggggg tgctgtaat ccttgctact 9840  
 tgggaggctg aggcacgaag atcacttgaa ccctggaggc agagggtgca ttgagtcgag 9900  
 45 attgagccac tgcactccag cctggggcac ccagcgagac tctgggtctc gcctgtaatc 9960  
 ccagcacttt gggaggccga ggcggggcga tcacgtcaga agatcgagac catcctggcc 10020  
 atcctagacc atttctacta aaaatacaaaa aaaaaaaaaa aaaaaattag ccgggctgtg 10080  
 tggcaggcgc ctgtagtccc agctactcgg gaggtgagg caggagaatg gcgtgaacac 10140  
 gggaggcgga gcttgcaagt atccgagatg gcgctactgc actccagcct gggcgacaga 10200  
 50 gcgagacttg gtctcaaaaa aaagagtaca tgggacgtta ttgtcctgtc tactctgtg 10260  
 ggtttgaagt tttccataat gacaatggca taccacatca ccatactctg cttttatatt 10320  
 aatagttctt atcacaattc gaactttctt tgcttctctg ttttgagtgt tttcctcatg 10380  
 aaagcttcat gagggttaaga atggagtgc cctttttcac tttgggttct caatgcttag 10440  
 agcaggatca gatttcagat tagtgtagcg ctgtctttaa cacttaacat ttgctgtttt 10500  
 55 tattcaccat ggactctaga actttgagca gcacctggca catcgtaaga ggttatTTTT 10560  
 taaagttaga ataatacatc taaaatgtac atgaatgaat gagaggcctg ggatgccaga 10620  
 ctaaagagct ttgacttggt ctaaagtgta tggggagcta ggcaaagggt ttgagagttt 10680  
 aactttaatt caaagttccc ttggagacta atgtctgggg tagggggaag ccagggttag 10740

5 ggtccggggcc atggaatggg gtagctcagt cgctatcaaa aagacaagac tgtgactatt 10800  
 tggctgaaga aatggccaaa cccagggttc tggggagggtc gaggtaccct cagtgaaggc 10860  
 aggaccttct cctggcctat actgtccacc agcaaccatc acactcctcc ctccctctc 10920  
 ccttagttcc cctcccaatg gtacagccct tgacagcagg acagacacac agccacccca 10980  
 aacacttggt ctctcctcag tttaatgggt gttagtgaaga ttgccaaacc ccctcccat 11040  
 tcccccccc acccgtaca aaatgtgtgt gtgggttttt gttttttgtt ttttgtttt 11100  
 taacaagaaa aaggggggcaa aagccaggaa tggggagagg ggggtgcaat ctgatatttt 11160  
 catacagact tttgattttt taatatatta tatataaac catgaagacc acgaatcctc 11220  
 cccaaactcc tttccccctc cccggggggc ctggaggaga gatggggaag gccccccag 11280  
 10 gagtgggtgg acagagagac aaatatggat gggacagacg ttgggggaga aggtagagag 11340  
 aaggggagcc caggaacctg ggggaagggg attggagaaa aggggtgggg ctgtctccct 11400  
 cactgcccc atcaaagtta tgacacaaag acacagaatc cctatttcca cgccctcccc 11460  
 ccacccatcc ccccaccgtg caaacatggc tttgcaaaga agtgcccaga gctctgtgga 11520  
 actcttaca tggctggcat ggggtctagg acccccaaag aaatctgtgt tccccctccc 11580  
 15 tgcccccccc acccttcca gaaactgacc cccctccca aagacctggt tttgtagcct 11640  
 agggggcctg gccttcccc agttatcttc ccccaaccca atccctactg ccctcactgg 11700  
 acttgggggg tctggacctt tggccctgc cccctggggg acccagacct ctgggcccctc 11760  
 acttctggcc cttacagaga tccaggcatc caacaccccc atccctgccc aagcgtctga 11820  
 ggtgttagtg gtggggggag aagcccacca tcccagactc tggtaaagt ctttgcctgg 11880  
 20 tcttgcagc tggcagtggg ggggacccca gccagggccc aggcctaggc ctgggggtggg 11940  
 gatagggtca gatgaagaat tctcttttc tcttgtgtcc gtcgctgcca ttgaggaagg 12000  
 ctctctctgc ttctccctgt tcatccaagc cactggcttc gtgggtcaga taggaacctg 12060  
 agggggtgac agacccccgg ggcagggggg acatatttgt ggatccagga gttggacaga 12120  
 agtataaggg aagagggaga cagacaagac acatgccagg cgaaggaaga gggagaaacg 12180  
 25 gaacacacag ggagaggcag agaaagggt aaacagtggc agagaaagag gtaaaagcag 12240  
 aattaggaag actccaaaag ctcaccgaaa gtgccaccct tatcctttct cttggaggta 12300  
 tttccttgcc ctgctcccag cgaattcagc aattaggaaa ataaattgtt ttattcaa 12360  
 ccattgctct ttttccctt aatttttgt atttttagta gaaaaggggc tgcgccatgg 12420  
 tgcccaggct ggtctcgacc tctagcttc tcaagtgtt tatccgcctt ggctcccaa 12480  
 30 cgtgctggga ttacaggcgt gagccaccgc gcccaaccgc aaatctatgc ttttaattca 12540  
 gcttctaaat tctaccctt tctgagtatt gtgccgaaag ccccgcccc tttgtcatct 12600  
 ccgcccccg tgccggcgga tttggaatcc agagcctagg ctccgcctc tegtaccct 12660  
 ggctctaggc ccgcctctt tccgagccct acaaccaacc aaccgtagag tccaggcccc 12720  
 gtcccactca ccttctgccc gtaccgagca ccagaccatg ccactagca cacatatgat 12780  
 35 cagaaacacc agcagcgcca ggtgccgcg cacaatggca tagggaaccg acgtctgagc 12840  
 ctctaccacc gcaccagggt ctgccagagg gacacggcac aggaccagg catcagga 12900  
 cgatcccagt ctggcccat cgctgccaag cttttaagcc attctgcaca cgtctaaccg 12960  
 tgccctttta tgtgccacac cctcaaaaa ttactgccac cttgtagtct cttctctt 13020  
 cagatgcttg ttggtttgta cactgcccga cccctccct gagtcatgtt acattttcct 13080  
 40 tttcttttct ttgtttctt ttgcagagac ggggtctca ctatgtggcc caggctgatc 13140  
 ttaactcct gggctcaagc gatcctccgg cctaggcctc ccaaagtact gggattagag 13200  
 gcgtgagcga ccgacccag ccattccctt tcttttgact caagtctct cctccactaa 13260  
 gaaacagagt ccaagaaaca ggtccaagtc ccttcccacc ttgtctaaaa cgctccaagt 13320  
 atttaaagt ctgggccccaa ctaccaaaat ttctgcccc cgtcataga gctaaacaca 13380  
 45 gaacagctgt gtgctagagc ccattccaac cacttacat atttagttca cataatctt 13440  
 acaacagcct tgttatatag gtgctattgt ttatttccac tttactgatg ggtaaactga 13500  
 ggcgcagaca ggttcggtta cctgcaatag aatgcagcca acccgaattt gagccccgcg 13560  
 ggccagtctg gtcccaaaac aaaaagaact ctgttggtg ccgaacccct gagttatgtg 13620  
 gcctctttgc tcaagccccg ccccgccac ctggcgcccc gcccccgccc tcagtcggcc 13680  
 50 gtagcctgct ctcaccgtag accacaagta cgtagagcgc cctcgcatgg ccgtgcttat 13740  
 tggagcctc gcaagtgtag gtgcccgtat ccgcggtac cagaccggc agcgtgagcg 13800  
 tctctccac ggctccgccc ctctccggca aagactcatt cccgcggtc cagcggtct 13860  
 ggtttggcct ggtggggat aaagtatagt gagagttagg aaccgagggt ccagcaccca 13920  
 attctgactt gtcaagaatc tagacatgca actctcatcc cgcagggacc tccaaataag 13980  
 55 aggtctcctg ctatctctt ctttctgga aaaccaacag tcctgggccc acttccaccc 14040  
 atcaccaagg tctcaggaat tctagcccag gctgaacatg gtggttatg cctgcaatcc 14100  
 cagcacttta ggaggctgag acgggaggac tgcttaaggc cagcagttcc agaccagcct 14160  
 gggcaacaca gggagacccc gtcactacaa taaaaaata ataataata taataataa 14220

|    |             |             |            |             |             |             |       |
|----|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------|
|    | tctagccctc  | ccacgccatt  | ccatcctcag | caaccaggag  | tctgaggctg  | cacagcttca  | 14280 |
|    | gtattgggga  | gtctgagcct  | ccagattcct | cctccctcag  | gatccaggag  | tccaggtccc  | 14340 |
|    | agatccctat  | tcgteccagg  | ccccagctct | ctcctcctca  | ggacccagga  | atccagggtcc | 14400 |
|    | tagctccctg  | tttgtccagg  | tcctcagctc | tctcctcctt  | aggacccagg  | agtcceaagtc | 14460 |
| 5  | cctgggtccct | gttctttccag | gtccccagct | ttctcctcct  | gaggacgcag  | gaggccccca  | 14520 |
|    | gagctcacct  | ggggttcccc  | gtgacagcac | acgtcaacac  | cagcgtgtct  | ccctccctca  | 14580 |
|    | ccacagcttg  | ggagggcatga | atccggggcg | tggggggagtc | tgtaggcaa   | aaagtaagagg | 14640 |
|    | agagagtagt  | ttccaagcca  | tcacgcagga | caagggggac  | cctcgcgggg  | gcgggtggct  | 14700 |
|    | ggcgttggga  | tcccttgggt  | cctggccccg | cggtcactta  | cactgcacat  | ccagcacgta  | 14760 |
| 10 | ctgctgtctg  | ttgctgtgtc  | cggaggggag | cgctgggttc  | tgcgcctcac  | agatgatgat  | 14820 |
|    | accaccgtcg  | tccttacggg  | ccacacgaaa | ccgtactgtg  | cttgccacgc  | tccagacctt  | 14880 |
|    | gccattttcc  | tgggtgtctg  | tactcctctg | cacaccccgg  | tcagacactg  | tcaggccaca  | 14940 |
|    | attccgggtc  | catccaccca  | cccacccgag | ccaacgccaa  | agcaggctat  | ttgccaagct  | 15000 |
|    | ccacccctta  | cccacaggcc  | cgccctcttg | tctccaagc   | tacgcccctc  | ccctaaccac  | 15060 |
| 15 | gcccacgtgc  | ctcctcccaa  | agctcttccc | tctttcacgc  | tcagtctttc  | tcgtctatca  | 15120 |
|    | atccatttaa  | ttgctatata  | tataaaaaca | taaatttata  | tataacttta  | gagacagggg  | 15180 |
|    | ctcacaatgt  | tgggcaggtt  | gaactcctga | cctcaagcaa  | tctctccatc  | tcagcctccc  | 15240 |
|    | aaagtgtctag | gactacaggc  | gtgagccacc | gcgctcgaca  | tcaaccacta  | catattgaat  | 15300 |
|    | gtccagtgct  | tgtgaaaacc  | tgtggctcct | ctccacatat  | aaacaacctc  | tcctaagttc  | 15360 |
| 20 | cacctctctc  | ccatcccttg  | tcagcactcg | gcccagggtg  | cctttcagct  | ccttgccggc  | 15420 |
|    | ccggtaccag  | cgaggggtgg  | cagccgcgag | ggacgcggga  | acgaggcagc  | tgagctccac  | 15480 |
|    | ctcgccgccc  | tctaccgcct  | gctcccggac | ctccaccaca  | ggattctctg  | gggccactgc  | 15540 |
|    | cgcagggaga  | agggaaagta  | ggggttaaag | aaggcacgaa  | cgtgggctca  | aagcgatcga  | 15600 |
|    | gctgcctgtt  | cccagcgacc  | atagggaaac | aggggtcccag | gtggcagggg  | tcaaagggga  | 15660 |
| 25 | gaggtcagga  | gccagatgcc  | catccaggat | gttaaaaata  | gccatggtct  | gaaagtctca  | 15720 |
|    | ggagaagaga  | gaagcagaga  | agaaaggagg | agaggatgcg  | tctgacaagg  | gggagggcgt  | 15780 |
|    | tacctagtac  | cgtgagcgtg  | gcaatctggt | gggtgggtgtc | ttctgtgtag  | agctggcaga  | 15840 |
|    | aatagccccc  | ctcgtcctcc  | aggcgggcat | ctgagagccg  | gatccgcacc  | cggcgtgggg  | 15900 |
|    | agaactcctc  | aagctggaaa  | cgctcatcct | tcaaggctag  | agagagtgag  | ggggaagggtg | 15960 |
| 30 | tgaatttcgg  | gagtcctggc  | ctcacaagtc | ccaccttccc  | gacaggagct  | tagagttccag | 16020 |
|    | ccctctgcct  | cttttctcca  | gccatatcta | tgagtctgag  | gtgtccaact  | atttactccc  | 16080 |
|    | ttgaggaccc  | agcattattc  | aagtcctcct | gcctgcagga  | ccagcagttc  | gggacccccag | 16140 |
|    | ccctttcttc  | tccgagaccc  | aggagaccaa | actctcaggt  | gtgtcctctt  | tcaggacatg  | 16200 |
|    | ggagcctggg  | ccccagccct  | ctcttctctt | aagactcctg  | agtctgggtc  | ccagcactca  | 16260 |
| 35 | ccacgggtgc  | cattgaagaa  | gagggctgtc | cgggtgggtg  | tctggatgac  | aactatggac  | 16320 |
|    | ccatcatact  | ggtgcagacg  | gcaggtgac  | tcagccaccc  | cacctcagc   | cactgtcacg  | 16380 |
|    | ttctctgtct  | gtacttctct  | tcctgcccc  | ggacgattag  | acaaagagac  | aggatagaag  | 16440 |
|    | acttactgag  | agctgcaatt  | caattttttc | ttctcctctc  | ttccccatcc  | aaacctccaa  | 16500 |
| 40 | tcctctctct  | tcccctcatt  | cattccattg | cactgaacat  | ttcctgcagg  | ctagagtcca  | 16560 |
|    | ggacagggag  | gaaatctgct  | ccctactcta | aaagagctgc  | agtcaagatt  | tagtagaata  | 16620 |
|    | tgtctaatg   | agggcagcac  | agggcacact | aggagcccag  | agcaagggag  | gactattata  | 16680 |
|    | gaattgccta  | gagagatggg  | tagccagaga | gggctctgca  | agaaagctcc  | attggatctg  | 16740 |
|    | gatcttaaa   | agtaagcagg  | aggctgagcg | cgggtggctca | tgcctgtaat  | cccagcactt  | 16800 |
|    | tgagaggccg  | aggtgggagg  | atcgcaagg  | caagagatag  | agaccatcct  | ggccaacatg  | 16860 |
| 45 | gtgaaacctc  | gtcactacta  | aaaatacaaa | aaaaaaaaaa  | aaattagctg  | gggtgtgggtg | 16920 |
|    | tgcgcacctg  | tagtcccagc  | tactcgggag | gctgaggcag  | gggaatcgct  | tgaacccggg  | 16980 |
|    | agttggaagt  | tgcagtgagc  | cgagatggag | ccactgcact  | ccaggctggg  | cgacagagcg  | 17040 |
|    | agactctgtc  | tcaaaaaaaaa | aaagaaagaa | aaaaaaagag  | aagcaggagt  | tcacaagggtg | 17100 |
|    | tgggagactg  | ctgtgtgttc  | accaagcctc | atctttcaca  | cctgggcaca  | tgttgtagcc  | 17160 |
| 50 | cgtttgcaaa  | gatagcgcta  | atatctcctc | gtccctggac  | atgccttttg  | caagttgatt  | 17220 |
|    | ttgccattcc  | tccatttgag  | aaggcacttt | gtcccttact  | agtcctgggtg | agccttgaga  | 17280 |
|    | gttgctttga  | ccaatagaat  | ttgctagaag | tgatattgag  | cctaggcctg  | aagaggcctt  | 17340 |
|    | gtagcttcca  | ctcctgccct  | aagactgttg | catgaagata  | cccagactag  | tgtctttgca  | 17400 |
|    | gatgaacaat  | catggtgaaa  | gagaagccca | gccggcagcc  | agcaccaatc  | gccagctgtg  | 17460 |
| 55 | tgagtgtggc  | catcctggat  | catccagccc | cagctgcccc  | accagctgac  | agcagccaca  | 17520 |
|    | caagtgaccc  | cagttgagac  | caataaaaga | tctgcccac   | tgatacagcc  | caaactgctg  | 17580 |
|    | aaccccgaaa  | tcatgaacaa  | ataaggtggg | gggtgtttta  | agctcctaag  | ttgtgggtga  | 17640 |
|    | tctgtctctac | tgctaaagtt  | aactgatata | atacataatt  | aggctatact  | tcccagcatc  | 17700 |

ctttatagtt aggtggggcc atgtgaccaa ttctggccaa tgggatgtag gtggaagaga 17760  
 aacacctctt gcagcctgac ccatctccct cataatcctt cacactggct gaacagagag 17820  
 gactccaagg agcctagagg agggcagaat cacaagccag aaggaaacctg ggtctctaac 17880  
 tgactgtccc ccatgacccg cctgtatagg actgtgatat gagcaagaaa tatacctttt 17940  
 5 tgttaagcca ttgagatttc aggggtgtct gttacagcct ttaacctacc ctgattaatc 18000  
 catcagaaaa acaaggtggg gaatctagaa ccatcagaga aaagcattta ggaaagctga 18060  
 aagccaagac taatcatcag cattaatcct atcatctgtt gtcttcaaaa taacaataac 18120  
 ccccatagct accaattatt aggtacttgc agtggttagtc cctgtgctaa gggcattacc 18180  
 catataactt acctttaatc ctacacatcc ctgtgtaagg tagacatgat tattatcatt 18240  
 10 attattatta ttttgggaca gagtattgct ctgttgccca ggctggagtg cagtgggtgtg 18300  
 atctcagctc attgaaacct ccacctccca agttcaagcg attcttcagc ctacgcctcc 18360  
 caagtagctg gaattacagg catgcaccac catgccgggc taatttttat ttttagtaga 18420  
 gacagagttt agccatattg gcctggctgg tctcgaactc ctggcctcaa gtgatccgcc 18480  
 tgcttcaagg tcccaaagtc cagggattac aggtgagacc caccgcgctt ggccaattat 18540  
 15 tattattatt ttttaattga gacaaggtca agctggagtg cagtggcagc atctcagctc 18600  
 actgcaatgt ctgcctccca ggctcgagtg atccacacct agcctcccca gtactggaa 18660  
 ctacaggtgc acaacatcac acctggctaa cttttgtatt ttttagaga cggagtttca 18720  
 ccgtgttgcc caggctggct ttgaacttgc gagctcaagt gaactgcctg cttcggcctc 18780  
 ccaaagtgtt gggattacag gcatgagcca ctgtgcccgg cctgcgctat tattatcccc 18840  
 20 attttggccg gcctgcgcta ctattatccc cattttcccc catttccatt tttcttttct 18900  
 tttttttttt tgagacattg tcttgcctct tcgccaggc tagagtgcag 18960  
 tggtaacgat tcggctcact gcaacctcca ctcccggtt tcaagcaatt ctctgcctc 19020  
 agcctcccaa gtactggga ttataggcac ctgccactgc acttggttaa tctttgtgtt 19080  
 tttagtaaag acgggtctc accatcttgg ccaggctggt ctggaactcc tgacctctg 19140  
 25 atccacccgc ctccgctcc caaagtgtg ggattacagg cttgagctat cgtgtcctgc 19200  
 tcccatctcc attttatagg tgagaaaatt gggccacaga gatgaaatga cttgcccaag 19260  
 ttcacagcca agagtggcag tgccaaaatc ttctgccaat tctctgattc tgtatcctga 19320  
 atctgtatat ccactcctgg ctgtctggat taagtgtcca tcattggcag ggggttgtga 19380  
 gacgcgcttg tgatgggct cgaatgccaa ctaggagat ttgctttcat cctaagggcc 19440  
 30 agtgaagggt ttgaagcagg aatatgccat gattagatct ggctatttgt ctttaagtcg 19500  
 tggataacta tccatgtctt ttacattcag gtgctgggtt gcattcattc aggagtattt 19560  
 cctgagcatc acgtagggtt tcaggggctg agtagtcaga gatgagttag atgaggtccc 19620  
 tgccctttta gatttatggg aaggtaggaa ccaatcacgg taatcaaaag tgttatgtgg 19680  
 ctgggcacgg tggctcacac ctgtaatccc agcacttttg gaggccgagg tgggcggatc 19740  
 35 acaaggtcag gagtctgaga ccagcctgac caacatggtg aaaccccgct tgtactaaaa 19800  
 atacaaaaat tagccagggt tgggtggtgg tgcttgaat tccagctact caggagctg 19860  
 aggcataaga atcgcttgaa cctgggaggc agaggttgca gtgagccaag atcgcgccac 19920  
 tgcagtccag cctgggtgac agagcaagac tccgtttcaa aaaagaaaaa aaaaaagaa 19980  
 ataaataaaa gaaagtgtta tgttttctgt aagagggtag gtaacctaat ttggaagtgt 20040  
 40 aggggtagaa aagattattt ctgggggatg gagacagaga cttctggctt cctattctga 20100  
 catccatttt tccctttctc ctacgtaaaa gaaaagaaca ctggttgtat tttatggttg 20160  
 cactatgtcc agcagaaaaa ggcattcctc agtctcctg cagcaaggta aagccatctg 20220  
 ataaaaattt gtccagttgg atataagcca aaatgttgcg tgacaatttt gggaggactt 20280  
 cctgaaacag gtggacaaac ctttttcta ctgagtcacc tttgtgccac ctggaactaa 20340  
 45 cagtgtgacg cgtggaattt aggcagccat attgaaccat gaggacaaga gcagtgggga 20400  
 tggcggaacc aagagctgga aggtgcctga gtctctggtg aagatgtgga gctgctgtaa 20460  
 cagccctcaa ctctagttc tggacttctt ttatgtttta gtgtaacgct ttgggtattt 20520  
 ttattttttt aattttattt agagatgagg tctcactatg ttgcctaggc tggactcaaa 20580  
 ctcttatgct caagcagtc tctgctca gcttcatgag tagctgaaac tatagcattt 20640  
 50 tgggtatttc agccactgtt tgaggttttt ctgacacctc ctggaatatc aagcttaaca 20700  
 tgtccaatcc ttgcccaga tattttctc cccaaatttt ctcaatctca ataaagtca 20760  
 ccaccatcca cctgggtgct caggtaaaaa acctagaaat cattcaagtt ctctccctt 20820  
 cctcatccc caatatccat tccatcagca acatctgtcc attctacctc caagacatat 20880  
 ccagatctc atcaccttg tctgcctctc ctaccctcac tctcatccag catcatccct 20940  
 55 cacctggact ctgcaaaagc ctactcgtgg gtctgtctgc atccctgtct gcctcctcca 21000  
 gggccattct ccacccagtg gccggatcga tttttcaag aggtaaatca gatcaattca 21060  
 cttttctgct taaaacctc cgagggtgc ccgtaacatg tagaataaaa tagagacccc 21120  
 ttcccgggga cttcaaggtg ctatatggcc tggcccttg ctgaccttac ttcactctgg 21180



gctcgttagc cttgctgtcc ctcaaaccatg ctgagctcgc tcccaccaca gggccttttc 21240  
 cctttttctt cttctgcctg gaatgttctt ctccccacct cccaagcccc atcttcccag 21300  
 ggctgactcc tgttcccatt tgggtctcaa atcatatcag taccttctca gagaggcctt 21360  
 ccctcactgc tcatcccttc accttttagaa cactttcttt tcttttaaga gacaaagtca 21420  
 5 gcccagtgcg gtggctcacg cctgtaatac cagcactttt gagaggccaa ggcgggcaga 21480  
 tcacctcagg tcaggagttc aagaccagcc tggccaacgt ggcgaaaccc cgtctctact 21540  
 aaaaaaatac aaaaattagc taggcagtgg tagcccgggc tactcaggag gctgaggcag 21600  
 aattgcttga acccaggagg cagaggttgc agtgagccga gattgagcca ctgcacccca 21660  
 acctgggtga cagagagaga ctctgtctca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agacagggtg 21720  
 10 ttgctctgtc acccaggctg gagtgcagtg gtgcaatcat ggctcactgc agcctcgaa 21780  
 tcctgggctc aagccatcct cccacctcag cctcctaagt agctgagatt ataggctcct 21840  
 cccaccacac ctggctaatt tttgtgcttt ttgtggagac acagattctc catgttgccc 21900  
 aggtctggctt ccaactcctg ggggtcaaag atcctcctgc ctcggtctcc caaagtctg 21960  
 ggattacagg cgtgagccac tgcgctggc ccagaacact tgctatttcc tcaccattgc 22020  
 15 tttatttctt ctatgaagat ttactggaa ttatcagatt aatttgctta tttgtttact 22080  
 gtctgtttgt caccatgac tggatgtat actctaggaa ggcagggata taatccaatg 22140  
 ggtttactgc tgcaccccta gtaccagaa gagtgccttg cacctgataa gtgtctgggg 22200  
 aacttgctac atgaattaca tgtgtcagat gggatctctg ttcgtctttc ttctctcttt 22260  
 tttctttctc tctttctctc tctctttctt tctctttctt tcttttttct ttttttgaga 22320  
 20 taaggtctcg ctctgtcacc cagggtcagag tgcagtgggt caatcatggc tcaactgcaac 22380  
 cttgaacatg tgggctcaag cgatctctcc acctcaggct accaaatagc taagactaca 22440  
 gaggtgcgta gctatgccc gctaattaaa aaaaaaaaaa tttttttttt ttttttagaga 22500  
 tgggggtctc aatatcttgc ccaggttgggt cttgaactcc taggctcaag caatccccct 22560  
 gccttggcct cccaaagtgc tgggattata ggcatgagcc attgcagctg gccagacag 22620  
 25 aatctcattt cagcccgaca actttgtgac atcattattt tcatctaaa cacctagggt 22680  
 gatcccagct caaccacttg ccactgtgtg gacctgtggg caagtgcctt tacctttcgg 22740  
 agcctcagtt gcccatcta taaaatggga atgatgccag tgcctgcctc ataaggatga 22800  
 gccccgctcc tgaagctcag ggagccctct ctgcaagggt gtttttagtg aacctccgga 22860  
 aacatgccc tgcattgtga aactggcatg cacattctgg tgcttttaaa aacatctcga 22920  
 30 agcctatcca cagatcctgg acctcaagac tgggtcagtg ctagccccc attttacaga 22980  
 tgtggagaat gaggtcttagc ggggtcccagg caagtgcagtg gcaaaactca ccatctcctg 23040  
 ggagccatca ggttcctctg gatctgcccc caccaaattt atccccgtct ctctgcttga 23100  
 ggggtgcacat ggggtgaggg tgggggtctt ttgttttact cctccccct cctgaggagt 23160  
 cagtaaccaaa cagtgtctgt gcctggaata ttaatgtctc agcagctttt gtttgggggg 23220  
 35 ttgggggtgg tgggggctgg accttctgggt ctagaggggg ctgagctttg gggactgagg 23280  
 cactggccct ttaaaactgt ttgacagcca ggagtcgtca tggggatggg gcttggaata 23340  
 ggggacaggg agggtttggg aaagagtggc ggagcaggta atgcgtaaga cccaggaatc 23400  
 cagcccccaa ctacctctc tcccaggacc caggagtcta ggctccagc ccctctcca 23460  
 tcaggttcca ggagtctgga acccgggctt ctttccgcct tagaccagg aattcagccc 23520  
 40 ccaaccacct cctctctcag gtccccgaaa tccagacccc tagccccct ctcgatcagg 23580  
 acccaggagt ctgggtctc agcagcccc tcttcaaac ctaggagtca gagccccca 23640  
 ccctctccta gcttagacac aggagtctgg gcctccagc ccctcctct tcaggaccca 23700  
 ggagccagg gtccagagta cacagctggg ggatgtttcc acggagacta agcaggggtg 23760  
 ggggagcgct tcctgggtcc tgagtcagcg aatacccaag ggagtctcaa ggtcatagtt 23820  
 45 ccgggaaggt caccaccacc cctctgtat ccgtcccca gggggctcct ggcacctgc 23880  
 ctcttcccc ctctctcct tagggagggt gtacatccct gcgtcctgac tgaaccccc 23940  
 tcagccccc atcaatggcg gagtccgaac atctcgcac aaagcgtcaa ttcttcccc 24000  
 gctcagcct gtgaaggcgc ctgtattctc aggacctagg cgtcagggtc tcagccccc 24060  
 ctccctcaga aacctgcagt ggaatcccc gcctccagc ccttctccc tcaggaccca 24120  
 50 ggagtctgta tctctatccc ttctctccc aagacctagg agtgtggact cccagcccc 24180  
 ttttctctcc ggacacagga gttccagccc tcggccctct cctctcttaa acccaggggt 24240  
 ctaagacccc agcctctctc tccctcaaac tcaggagtct aagatcccag gccctctc 24300  
 cctcagactc aggagtctaa gatcccagg ccctcctccc tcagactcag gagtctaaga 24360  
 ccccaggccc ctctctccc agactcagga gtctaagat ccaggcccc cctccctcag 24420  
 55 acccaggagt ctaagacccc agccccctc ccctcagact caggagtcta agacccagc 24480  
 cctctccc tcagactcag gagtctaaga cccagcccc ctctcctg gaccaggag 24540  
 cctaagacct cagccccctc ctcttgaga ccaggagtc taagacctc gctccctc 24600  
 cctttagacc cattagtcca ggccccaga ccctcctcca tcagaccag gagtccaggc 24660

|    |             |             |             |            |             |             |       |
|----|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------|
|    | ccccagcccc  | tcttccatca  | gateccagccc | ctcctctcct | gaaaactttt  | gactctaact  | 24720 |
|    | ccccagtcct  | caacccctag  | aagcacagtc  | ctgcctttcc | tcaatcctct  | gtccccctcc  | 24780 |
|    | atctggggac  | ctagggcatca | ggtgggggag  | taggggtgag | tcagcaacct  | cacacacaaa  | 24840 |
|    | gtccccgctg  | tggccccccac | attcctggga  | tattcgggac | tccctggatt  | ccaggcctca  | 24900 |
| 5  | ggccccagcca | gggagtgggg  | agtccccag   | aggctcctcc | tgggtgtggg  | gtacgagagg  | 24960 |
|    | aattcctgct  | ccgggaaggg  | tgcaggcctg  | cactgagctc | cctctgtccg  | aacctccacg  | 25020 |
|    | cccagtgccc  | tctattcacc  | ccctcttccc  | agaagagccc | aggctcagca  | cctgcccctt  | 25080 |
|    | gccccactgg  | gtgcccacgg  | aggagcctgc  | gtgcctgctc | cctatgggccc | tggggctctgc | 25140 |
|    | acaggcgga   | atcagtgggt  | gcttccgttc  | tgatgccaca | ggccattgga  | tgctggcggg  | 25200 |
| 10 | tctgactgtc  | tccaggccac  | ccccacccc   | tcccagagag | agaaagctgc  | ctttgtgttc  | 25260 |
|    | tccaagatgg  | ggacaggcca  | ggctcgacag  | acattaaccc | agccttaggc  | cccagccctg  | 25320 |
|    | ctgtgtctaa  | ggtcttgga   | tccactgcag  | aacctgaccc | ccacccccag  | gctctgggga  | 25380 |
|    | cacaggcgcc  | tggctcatgg  | gtgggtgggt  | gggggggtca | gtgatagaaa  | cctccaaaac  | 25440 |
|    | ctgttccttg  | gggtgactca  | caatggaggg  | agggctcccc | tattctcaag  | agtggctgggt | 25500 |
| 15 | cagaatttta  | gcaggaaaaa  | gtgagtcacc  | ctgggaagga | aacattattt  | agggaccaac  | 25560 |
|    | aactgcccc   | tccacaagac  | ccctcaactc  | ctaatagcct | ctctattctt  | tctttgtatt  | 25620 |
|    | ggatatctgt  | tctctctcct  | cctttctgtt  | ctaccagtt  | tctggctgcg  | gggtccattt  | 25680 |
|    | ctgcctgggt  | gcattccctg  | gcaggcaacc  | catccctccc | tcttgctttc  | tctcctctgc  | 25740 |
|    | ccaccctgga  | tccttctttg  | ggcataaate  | tcattcttct | ctgctatgct  | cagaagatga  | 25800 |
| 20 | atgaaccagg  | agagagagaa  | catgttttta  | aaatggcgca | aatgcacccc  | atctcccccg  | 25860 |
|    | attcctgctg  | gctgggcaag  | gtgagagagg  | aagaagtgc  | taagagagaa  | atgtgggaac  | 25920 |
|    | aacagatacc  | ccctaaaatg  | tggtagccaa  | ggccactgag | aaatatccaa  | tggaaaaggag | 25980 |
|    | agcaggaagg  | gcccccaag   | accacatgct  | acagcctcct | accccatgct  | ttacagacag  | 26040 |
|    | ggaaagtaag  | gcccagagag  | ggacaaggac  | tgatgcaaaa | ttatactaaa  | gggtcctggg  | 26100 |
| 25 | taaggcttgg  | acccaagtct  | cttagctccc  | agctgagagc | tcttcccatg  | acaccaagct  | 26160 |
|    | cagtttctac  | tggtaaaagc  | cacatactat  | ttactttaga | gaaagtttac  | agagagggtt  | 26220 |
|    | aggggtgccg  | gaagcagtga  | cttggaatc   | aaacgagggg | cagggctgta  | gacctaaact  | 26280 |
|    | ccagaagcac  | cagagaaagg  | cttttgacag  | ggcggggtgg | tcaccttaag  | ctatattctg  | 26340 |
|    | atcctgagaa  | ttcaaaagtct | gatgattcta  | agctgtcagg | attctaaatg  | tcatactatg  | 26400 |
| 30 | caagatccag  | gaactccaag  | acatcaagat  | ttcacgattt | ttaagacgct  | aagatgctag  | 26460 |
|    | catgctaaca  | ccatcacggt  | tctagaactt  | taaagggtgc | aagattctaa  | agccttctgg  | 26520 |
|    | attctagaat  | cctgtagatg  | tcagcattct  | aaagtacat  | caggttcttt  | atttactgga  | 26580 |
|    | ttcattagtt  | ccaggattct  | atgagcctgg  | tgtttagcct | aaaaaataaa  | gataaattaa  | 26640 |
|    | aattgatgga  | aatgtcactg  | aggtagcaaa  | gttctcatct | gggaaattgt  | ggcatgtctg  | 26700 |
| 35 | ttgtaagaaa  | aggaggtaat  | gatgcaagtt  | ctaaagcagt | cacagaagac  | tagagaagaa  | 26760 |
|    | agaaaagaca  | tgagaggaca  | gctttgcccc  | cctcctggc  | cgaggtgagg  | atggctctgc  | 26820 |
|    | ctcaaacctt  | ggagtgggga  | acatgtaacc  | gcactcaact | tgccagaaac  | cccttcacgg  | 26880 |
|    | tctgagctgg  | cgttcccttt  | catgtcactg  | agttcaacat | cctcacttta  | cagaaagaga  | 26940 |
|    | aacagaagcc  | tggagagagg  | aagggtgtta  | ccattggctg | cgatggcaaa  | tggcaagagc  | 27000 |
| 40 | caagatttaa  | gcccaggccg  | ccagccccc   | gccacctggt | tataactcct  | ctcaccaatc  | 27060 |
|    | tctgccgaac  | acccagccct  | cctgcttctg  | cctagccacc | ttccaatcct  | ctgttccctt  | 27120 |
|    | caaaagtggc  | cttatccacc  | agggaggggt  | gacccgtggc | aggttcaaga  | cttacacagt  | 27180 |
|    | gtgagagtgt  | gtgtgggtga  | catttcctga  | ccttgctccc | attctcaggg  | tcaccaacc   | 27240 |
|    | tcgggggtct  | ccagcttctc  | acagtgtgtg  | atgagggtat | gtggatggct  | ccctggatgt  | 27300 |
| 45 | cctggacagg  | ggcttctctg  | tgagtcaagc  | ctgggtgtgt | gaatgggtga  | gcagggtttg  | 27360 |
|    | gagaggcatt  | cgctgaatcc  | acgtgtgtgc  | ctacacgcca | aggtccccc   | ttctcacttc  | 27420 |
|    | cccacacaca  | tgcacacaga  | tgttccccct  | cagggctctt | tagaatgccc  | tgctgactg   | 27480 |
|    | aattcctctt  | caggggcaca  | gagggataga  | gagaggagg  | aaggtaggat  | gggaatggga  | 27540 |
|    | gatccccggg  | tggaggctgt  | aagcgtagag  | agaggaggca | cagcagaaag  | acagggatgg  | 27600 |
| 50 | agatagtggg  | acagagaagg  | gggaaagaga  | caggtgacag | aaagggttag  | agaaaagagt  | 27660 |
|    | gacagaaaaga | caggggacag  | agacaagggg  | atggggcaga | taggggacag  | agaaaaaggg  | 27720 |
|    | acagaaaaac  | aagggtgaca  | gcgagacaga  | gacagggacc | aagaataggg  | gcagagaggg  | 27780 |
|    | agggcagaaa  | tccgggggaa  | agagaataga  | caggatgatg | gaggggacag  | agtgaccacg  | 27840 |
|    | gaaaagggga  | cagagaccag  | gggacagagg  | taggggacaa | agacagaata  | gatgaggaac  | 27900 |
| 55 | accgaggcaa  | gaagagaggg  | agacagacag  | aaggagggac | aggacttcga  | gactgagggg  | 27960 |
|    | tagaggacaa  | gggtaggggg  | acgaggagcc  | agacgggggg | gttcagagac  | gggcggacag  | 28020 |
|    | agggacgcag  | agactggaca  | gaaggacagc  | gggaccggcc | tggggagggc  | ggacttgtgt  | 28080 |
|    | gtgtaggggg  | gtctcggggc  | ctttgtcccc  | gccgggatcc | agcctgcgcg  | ggtggggggg  | 28140 |

|    |             |             |             |             |             |             |       |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
|    | ctgcggcacg  | gcggccgggc  | cccgcgcccc  | ctcccccgct  | cgctcgctccc | ggctccccggc | 28200 |
|    | ccgcgctgcg  | ctttgtcccg  | gggagggggc  | ccggccccggc | cccgcgcgca  | ttgttcggcc  | 28260 |
|    | tctgcggccc  | cgaggctgcc  | gggctgtcac  | cacagcgcg   | cccccgcccc  | agccccggccg | 28320 |
|    | gccgaccccc  | gcccccgacc  | ctacctggcc  | ccgcgcgggc  | cgcccacagc  | agcagcagcg  | 28380 |
| 5  | gccactggaa  | gcgcggggcc  | cggcccatgg  | tgccgcggcc  | gccgcgcggc  | ccgctcgctc  | 28440 |
|    | ccggccccggc | acctgcaccg  | cccgcgccgc  | ccgccccgcc  | ccccgcgccc  | cgccccctgc  | 28500 |
|    | ccgccccggg  | gcggggcgcc  | gaggccgggg  | cggggccggg  | gaggggaggg  | ggagacggag  | 28560 |
|    | gagaggcccc  | gagacaatcg  | gggggacggc  | acgggtgggg  | aacgggtgcg  | ggtgcaaaag  | 28620 |
|    | ctggagagga  | gaggggtgag  | gagggcgggg  | aggggtgcgc  | gggagggcga  | cagcggcgctg | 28680 |
| 10 | ggagcaggtg  | ggggatctcg  | gtgagcgcg   | gaaatggagg  | gtgttgggtg  | aggggtgctgc | 28740 |
|    | gtgcgggccc  | aggtgctgcg  | cgcgaggggtg | cggagttgct  | ggcatgcagg  | gtgcttgcgc  | 28800 |
|    | tgccgcggagg | ggaggggtggc | aggggtgtgc  | tggagggctgt | gcgaggggtg  | gggcgcggggc | 28860 |
|    | gtcgtgggggt | gcgggtgtgtg | gcgaagggaga | cgtgcccag   | cgtgacgggg  | gagcgttaagg | 28920 |
|    | gagggagtg   | gacgtgggaa  | aggtgagtg   | gagagggcgtg | ctgcgggcag  | gtgggtgtct  | 28980 |
| 15 | ggagtctagc  | gagaggctgt  | gagctgagcc  | accgggacag  | gggagggctgc | agctggaggt  | 29040 |
|    | ccggaggggtc | cggaggtcga  | ggcaggtcaa  | ggatctccca  | gggcagggcg  | aggctggggc  | 29100 |
|    | tcaggagtg   | ggtgggggtca | gttcctctcc  | tccctctctc  | ctgtcctgac  | ctgaaaaccc  | 29160 |
|    | cgtgtttccg  | cgtcattctc  | cgggaggggc  | ccctgaaaag  | tgaactaact  | ggaaggaagc  | 29220 |
|    | ctgaatcctg  | ggtcccagga  | gggagaggtc  | cctgtgaaca  | ccttccaagc  | cctggcgctg  | 29280 |
| 20 | ccctcctctc  | ctgctgtctc  | ctgcgccag   | ctctctccc   | tctctctgca  | tgtatttgc   | 29340 |
|    | tctgcctctc  | ctctctcccc  | atctttgagg  | gtgactcacc  | cctccagact  | taggtccctt  | 29400 |
|    | ctcctcctcg  | ggagtgggtt  | tccctgagcc  | cacttctgtg  | acacctgta   | gacctgatgc  | 29460 |
|    | gggatcatta  | cctatgggac  | ccagaaagag  | tgagaaacca  | tggaaagaag  | gcctcgacct  | 29520 |
|    | ctctcatgcc  | catttgtcag  | gcaaactgag  | gtccagaagt  | gccaattatg  | aacatctttc  | 29580 |
| 25 | cttccccctc  | ccccctctcc  | cgcgccagacg | gagtctcgct  | ctgttgccca  | ggctggagtg  | 29640 |
|    | cagtggcacg  | atctcgactc  | actgcaacct  | ctgcctccca  | ggttccagtg  | attctcctgc  | 29700 |
|    | ctcagcctcg  | cgagtagctg  | agattacagg  | cgcgcgccac  | catgcctagc  | taatttttat  | 29760 |
|    | atcttctagta | gagacggagt  | tttgccatgc  | tggccaggct  | ggtcttgaac  | tccttaacctc | 29820 |
|    | aggtgatcca  | tctgtctggc  | ctcccaaagt  | gctggattac  | aggcgtgagc  | cacctatgct  | 29880 |
| 30 | ggctgaaaat  | ccttactttt  | tattccgact  | aaaaaatttt  | acatccagtc  | ccacaaggga  | 29940 |
|    | cttcagcttc  | acacaccctt  | tctgtcctca  | gtaccagct   | cccagtatcc  | ttcttgacct  | 30000 |
|    | caaaaccata  | gctaccatca  | acccttgtgt  | cccaggacca  | tggctcccag  | tgtcttctct  | 30060 |
|    | gtcctcaggg  | tccaagctcc  | catcaactcc  | tgtgtcctca  | ggaccacggc  | tcccagcatc  | 30120 |
|    | ctctctgtcc  | ttcaggtcca  | agctcccatc  | aacccctgtg  | aagcaggacc  | atggctccca  | 30180 |
| 35 | gcctcctctc  | tgtcctcagg  | gtccaagctc  | ctatcaactc  | ctgtgtcccc  | aggacgatgg  | 30240 |
|    | ctccagcaat  | cctctctgtc  | ctgagagccc  | aagcttctaa  | ctgcccctgt  | gtccccagat  | 30300 |
|    | ccatagccct  | gagcaacttc  | cttctttttc  | agtcctcagc  | ttcccagctt  | ctgtagactt  | 30360 |
|    | gggaagagat  | agtctcta    | cctctttcca  | gggtcacat   | tctgtgactt  | ttgctagatg  | 30420 |
|    | ggagaggaat  | gtttgatctg  | cctttggaat  | actgggtccaa | ggggtaacta  | gtagttgcct  | 30480 |
| 40 | tttcccgcag  | gagccaatag  | gcccgtcac   | tctgtgctct  | gacagatgtc  | tcctgtctca  | 30540 |
|    | gctgaagggg  | aaccttggga  | gatgttggtt  | tggttctcac  | ctgtcatcct  | taagtccac   | 30600 |
|    | cattccatgt  | gaagacatca  | caagagtagt  | ggtcctgacg  | ggcgcggttg  | ctcacacctg  | 30660 |
|    | taatcccagc  | actttgggag  | gccaaagggtg | gccgatcact  | tgagggtcagg | agtttgagac  | 30720 |
|    | cagcctgacc  | aaccggccaa  | catgggtgaaa | cacctctttt  | acaaaaaaa   | aaaaaaaaaa  | 30780 |
| 45 | ttagcaaggc  | gtggtggcac  | gtgcctgtaa  | tcccagctgg  | tcggaaggct  | gaggcatgag  | 30840 |
|    | aatccccctga | acttgggagg  | cagaggttgc  | agtgagctaa  | gatcatgcc   | ctgcactcca  | 30900 |
|    | gcctgggtga  | cagaatgaga  | ctcagtctaa  | ataataataa  | taataataat  | aataataata  | 30960 |
|    | ataataataa  | taaatagaat  | agtggctcctg | tccccatcct  | acttcagggt  | accctgtcca  | 31020 |
|    | ttaggggattt | agtgcgaagt  | acagcaagt   | caacccaact  | ggtttgagag  | aaagagaact  | 31080 |
| 50 | ggttcacaca  | taacaaaaag  | tccttctatg  | ctgggctttg  | gcgaggtctg  | tcaatctctg  | 31140 |
|    | tcctaaggat  | gcatggctcc  | cctcctgtag  | caagatggct  | ggcagatacc  | cctggggcca  | 31200 |
|    | gattcatatt  | tgggggtgatt | aagattctgc  | aagagagaga  | caacctttat  | ttcacacagc  | 31260 |
|    | ttttcaattg  | ttgcctgtcc  | ctggtgagac  | tcggagacct  | agctcttgcc  | tggtttctaa  | 31320 |
|    | actttcaata  | acaccgtttt  | tgcttaagtc  | agcacaacaa  | gattttat    | cttgcaagca  | 31380 |
| 55 | aagattcctg  | aacaacaact  | tcagagccgt  | taacaatgag  | gtcctgatca  | caagctatgg  | 31440 |
|    | tataggacgt  | gagaaatttg  | tccttagcct  | caatatctgc  | tggagggcat  | catggaataa  | 31500 |
|    | gtatttctat  | cctctgatcc  | ccactgtagg  | gcacatggg   | atatataatc  | ctaaccttca  | 31560 |
|    | atctctgcca  | tagagtttca  | taggcaatgc  | agtcctagcc  | tcaatatgtt  | gtaggggaatt | 31620 |

atgggaaagg tgaattatc ctcaattata atacagagca tctcagaaaa tgtcgtttta 31680  
 gcctcatctc tgctgtaggg catcatggga gatatacttc tggcccaatt tttgttgtaa 31740  
 gttgccatag aagatgcagt ctttccttcc ttcctttttt tcttttcttt ctttctttct 31800  
 tttttttttt ttttattatg tagagacagg gtctctcgct atgttgccca ggctggctct 31860  
 5 gaactcctgg gctcaagcag ttctcctgcc ttggcctccc aaagtgcctg gattacaggc 31920  
 aagagccatt gcacccagtc ccttctctcc tttctttctt catcacctgc catattccag 31980  
 gcactaggaa taaatcatca agtaaaataaa cggccttacc ctccctggca attataatgg 32040  
 ggaaagttag ctaaaaaaaa acaaaaatta ctgttccatt taaccatcgc tgaataaaca 32100  
 aataccccag aacgtagtgg tgtgaaacaa caacctttta attttatgat tctgtgagtc 32160  
 10 aggaattgga gcaggattgg tgtgtatctg cttcatgatg aactggagcc aaaaatgaac 32220  
 tagctggaac agctggagat ggagggggagg ggcatacagg gccatatatc taaggctggt 32280  
 ggttggtggt gtgggttttg aatagtgtcc tccaagtaaa atatatgttg aagttctagc 32340  
 ccctggatc tgtacatgtg accttatttg gaaataaaa ctttgcaaat gtaattcact 32400  
 tttttgtttg tttgtttgtt tgctcgagac tgagtctcgc tctgtcacc aggctggagt 32460  
 15 gcagtggcat gatctcggct cactgtaacc tgcactcctc ggggttcaagc gattctcctg 32520  
 cctcagcctc ccaagtagct gggattatag gcacgtgtca ccatgccag ctaatttttg 32580  
 tattttcagt agggacgggg tttcaccatg ttggccaggc tggctctgaa ctctgacct 32640  
 caaatgatct gccacctcag cctcccaaag tgctgggatt ataggcatgg ggcactgcat 32700  
 cctgcccaga tgtgattaac ttctaaccctc tggatctctt gcatgtgact ttatttgga 32760  
 20 ataagggtggg tttttttctt gttttttttt ttttttttga gacagtttca ctttgcgt 32820  
 caggctggag ttcagtgtca taatctcagc tctactgaaac ctctgcctcc gaggtcagg 32880  
 cgatcctccc gcctcagtct cccaggtcac tgggactacg ggcaagcgcc accacaccg 32940  
 gctaattgtt gcagtttttg tagagatggg gttttgccat gttgccagg cggctctcaa 33000  
 ttgccaccct caagcaattc atccgcctcg gcctcccaga gtgctggaat tatagggtg 33060  
 25 agccatggcg cccggccaga aagtctttgc agatttagtt gaattaatga ctaaattgtt 33120  
 ccagtctgag ttagagtggg ctctaaatcc aatgattgat atgggggttat aaggagagat 33180  
 atttggagac atagccacag tcccagggaa ggtggacatt ggaagacaga ggtagggatt 33240  
 agagtgtgag agctacaagc caaggaatgg caaagattgc tggcagtcct tcagaagcaa 33300  
 aggagaggca aggaagggtt cttcccctga gactttttt tttttttttg agacggagtc 33360  
 30 tctactgctg cagcctcagc tggagtgtca tggcgctgac tgggctcact gcaacctctg 33420  
 cctcccagg tccagcaatt ctctgcctc agcctcccga gtaactgaga ttacaggcac 33480  
 ccgccaccat gcctggctag tttttgcatt tttagtagag atgggatttc accctgttgg 33540  
 ccaggctggt ctggaactcc tgacctcagg tgatccacct gcctcggcct cccaaagtgc 33600  
 tgggattaca ggtgtcagcc cgggagactt taaaagcatg gctcttcccc tgacgtttta 33660  
 35 aaagcgtggc tcttccgtg agacttcaac accttgggtt tggacattta gcattcagaa 33720  
 ctgtgagaga acaagtttct agtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 33780  
 tgtgtgtgtg tgtgttttag acagaggctc attctgttgc ccaggctgga gtgcactggt 33840  
 tcaatctcgg ctactgcaa actccgcttc tcagattcaa gtgattctta tgcctcagcc 33900  
 tcccaagtag ctggaattac agaggagcgc catcacagcc ggctattttt tttttttttt 33960  
 40 tttgtacttt tagtagagac aggttttcac tgtgttggtc aggtgtgtct caaatcctg 34020  
 gcctcaagt atagcctgc cttggcctcc caaagtgtg ggattacagg tgaagccac 34080  
 cacacctggc ctaagtctct gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt tgttttgttt tttttttttt 34140  
 tttgagtggg gtctcgctct gttgccagg ctggagtga gtggcatgat ctgcactcac 34200  
 tgcaagctcc gcctccggg ttacgacct tctcctgcct cagcctccc agtagctggg 34260  
 45 actacaggca cccaccacca cgcccagtta attttttgta tttttaatag tgacagggtt 34320  
 tcatcatgtt agccaggatg gtctcgatct cctgacctcg tgatccgccc gcctcagcct 34380  
 cccgaattgc tgggattaca ggcattgagcc accaaaccg gccaaagttc tgtggtttta 34440  
 agccaccttg cttgtaagat ttgtgtgtgt gtgtttttta ttttttatt ttaagtatta 34500  
 tgaatacata atagtgtgt atatttacag gacatatgta atatggtttt gggtttttagt 34560  
 50 gttttttttt tggagacaga gtctggctct gttgccagg ctggagtaca gtgggtggg 34620  
 catggctcac tgcagcctg acctccggg tcaagggat cctcctgcct cagcctccca 34680  
 tgtaactagg accacaggca tgccccacca catccagcca attttttttt atttttagt 34740  
 gagatgaggt ctactgtgt tgcccaggct gatcttgaac tcctgagctc aagagatctt 34800  
 cctttctcac cctcccaaag tgctaggact acaggcatga gccactgtgc ctgtccttcc 34860  
 55 atgatgtttt gatataggca cacaatgtgt tagtttataa agtttgtaat aatttatcac 34920  
 aggcagccct aggaaactaa tatagccaag tttcctgttt cttctctata tcacatctgc 34980  
 tggggctaca tgtccaaggt ggcttcttca cccacttgtc tgggtgcctg gctgagatgg 35040  
 ctgaaacatc tggggctcta tctccacatg gcatttatac atgagtagct tgggcttctc 35100

cacagcatgg tggctctcagg gcagtagtac ttttacatgg caaccagctt cccagagtg 35160  
 agcgttctaa gattcagaaa gtgaaaaatg aaagtttctt aaaacttggg tccagaacat 35220  
 agcacagcaa aacttccacc acattctact ggtcaaagca gtcacagagt cactcatatt 35280  
 caagaggcag aagtacagac ctacttctt taagccacta cagtgcacagg tggatgatg 35340  
 5 tcattagaga aagccctaaa caagaacctt gtccctcacc tgcccccata taccatggaa 35400  
 gatgtctttt tttttttttt tttttttttt gggatagtct cactgtgtca tgcagtggg 35460  
 tgatc 35465

10 <210> 57  
 <211> 14327  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 57  
 ggccggcgag cggcgggctg cggcgggcgc ggagcgggag cgcgggagcg agcgagcgag 60  
 agagcggcgc ggccggggcc atgggggtggc gggcgccggg cgcgctgctg ctggcgctgc 120  
 tgctgcacgg gcggtgctg gcggtgaccc atgggctgag ggcatacgat ggcttgtctc 180  
 tgctgagga catagagacc gtcacagcaa gccaaatgcg ctggacacat tctaccttt 240  
 20 ctgatgatga gtacatgctg gctgacagca tctcaggaga cgacctgggc agtggggacc 300  
 tgggcagcgg ggacttccag atggtttatt tccgagccct ggtgaatttc actcgtctca 360  
 tcgagtacag ccctcagctg gaggatgcag gctccagaga gtttcgagag gtgtccgagg 420  
 ctgtggtaga cagctggag tcggagtact tgaaaattcc cggagaccag gttgtcagtg 480  
 tgggtgttcat caaggagctg gatggctggg tttttgtgga gctcgatgtg ggctcggaa 540  
 25 ggaatgcgga tgggtgctcag attcaggaga tgctgctcag ggctcatctcc agcggctctg 600  
 tggcctccta cgtcacctct cccagggat tccagtccg acgctgggc acagtgcctc 660  
 agtcccaag agcctgcacg gagccgagat ttgctgcca cagctacaat gagtgtgtg 720  
 ccctggagta tcgctgtgac cggcgggccc actgcaggga catgtctgat gagtcaatt 780  
 gtgaggagcc agtctgggt atcagcccca cattctctct ccttgtggag acgacatctt 840  
 30 taccgccccg gccagagaca accatcatgc gacagccacc agtcaccac gctcctcagc 900  
 ccctgcttcc cgggtccgtc aggccctgc cctgtgggccc ccaggaggcc gcatgccgca 960  
 atgggcactg catccccaga gactacctct gcgacggaca ggaggactgc gaggacggca 1020  
 gcgatgagct agactgtggc ccccgccac cctgtgagcc caacgagttc ccctgcggga 1080  
 atggacattg tgccctcaag ctgtggcgct gcgatgggtga ctttgactgt gaggaccgaa 1140  
 35 ctgatgaagc caactgcccc accaagcgct ctgaggaagt gtgcggggccc acacagtctc 1200  
 gatgctgtct taccacatg tgcatcccag ccagcttcca ctgtgacgag gagagcgact 1260  
 gtcttgaccg gagcgacgag tttggctgca tgcccccca ggtggtgaca cctccccggg 1320  
 agtccatcca ggcttcccgg ggccagacag tgaccttcac ctgctgggccc attggcgtcc 1380  
 ccacccccat catcaattgg aggtcaact ggggccacat cccctctcat cccagggtga 1440  
 40 cagtgcaccg cgagggtggc cgtggcacac tgatcatccg tgatgtgaag gactcagacc 1500  
 aggggtgccta cacctgtgag gccatgaacg cccggggcat ggtgtttggc attcctgacg 1560  
 gtgtccttga gctcgtccca caacgagggc cctgcccctga cggccacttc tacctggagc 1620  
 acagcgccgc ctgctgccc tgcttctgct ttggcatcac cagcgtgtgc cagagcacc 1680  
 gccgcttccg ggaccagatc aggtgctgct ttgaccaacc cgatgacttc aagggtgtga 1740  
 45 atgtgacaat gcctgcgcag cccggcacgc caccctctc ctccacgcag ctgcagatcg 1800  
 acccatccct gcacgagttc cagctagtag acctgtccc cgccttctc gtccacgact 1860  
 ccttctgggc tctgctgaa cagttcctgg gcaacaaggt ggactcctat ggcggtctcc 1920  
 tgcgttacia cgtgcgttac gagttggccc gtggcatgct ggagccagtg cagcggccgg 1980  
 acgtggtcct cgtgggtgcc ggggtaccgc tctctctcc aggccacaca cccacccaac 2040  
 50 ctggtgctct gaaccagcgc caggtccagt tctctgagga gcaactgggtc catgagtctg 2100  
 gccggccggg gcagcgcgcg gagctgctgc aggtgctgca gagcctggag gccgtgctca 2160  
 tccagaccgt gtacaacacc aagatggcta gcgtgggact tagcgacatc gccatggata 2220  
 ccaccgtcac ccatgccacc agccatggcc gtgcccacag tgtggaggag tgcatatgcc 2280  
 ccattggcta ttctggcttg tctgctgaga gctgtgatgc ccacttact cgggtgctc 2340  
 55 gtgggcctta cctgggcacc tgctctggtt gcagttgcaa tggccatgcc agtccctgtg 2400  
 accctgtgta tggccactgc ctgaattgac agcacaacac ggaggggcca cagtgaaca 2460  
 agtgcaaggc tggcttcttt ggggacgcca tgaaggccac ggccacttc tgcggccct 2520  
 gcccttggcc atacatcgat gcctcccga gattctcaga cacttgcttc ctggacacgg 2580

atggccaagc cacatgtgac gctgtgccc caggctacac tggccgccc tgtgagagct 2640  
 gtgcccccg atacgagggc aaccccatcc agcccgccg gaagtgcagg cccgtcaacc 2700  
 aggagattgt gcgctgtgac gagcgtggca gcatggggac ctccggggag gcttgccgt 2760  
 gtaagaacaa tgtggtggg cgcttgtgca atgaatgtgc tgacggctct tccacactga 2820  
 5 gtacccgaaa ccccgatggc tgctcaagt gcttctgcat ggggtgtagt cgccactgca 2880  
 ccagctcttc atggagccgt gccagttgc atggggctc tgaggagcct ggtcacttca 2940  
 gcctgaccaa cgccgcaagc acccacacca ccaacgagg catcttctcc cccacgccg 3000  
 gggaaactggg attctctctc tccacagac tcttatctgg accctacttc tggagcctcc 3060  
 cttcacgctt cctgggggac aagggtgacct cctatggagg agagctgctc ttcacagtga 3120  
 10 cccagaggtc ccagccgggc tccacacccc tgcacgggca gccgttggtg gtgctgcaag 3180  
 gtaacaacat catcctagag caccatgtgg cccaggagcc cagccccggc cagcccagca 3240  
 ccttcattgt gcctttcccg gagcaagcat ggcagcggcc cgatgggag ccagccacac 3300  
 gggagcacct gctgatggca ctggcaggca tgcacacct cctgatccga gcacacctacg 3360  
 cccagcagcc cgctgagagc aggtctctc cctcagcat ggacgtggct gtgcccagg 3420  
 15 aaaccggcca ggaccccgcg ctggaagtgg aacagtgtc ctgccaccc gggtagcgtg 3480  
 ggccgtcctg ccaggactgt gacacaggct acacacgcac gccagtgcc ctctacctg 3540  
 gtacctgtga acgctgcagc tgccatggcc actcagagg ctgcgagcca gaaacaggtg 3600  
 cctgccaggg ctgccagcat cacacggagg gccctcggtg tgagcagtgc cagccaggat 3660  
 actacgggga cgccagcgg gggacaccac aggactgcca gctgtgccc tgctacggag 3720  
 20 accctgtgc cgccaggct gccacactt gtttcttga cacagacggc caccacact 3780  
 gtgctgcgtg ctcccaggc cactgtggc gtcactgtga gagggtgccc cctggctact 3840  
 atggcaacc cagccaggc cagccatgcc agagagacag ccaggtgcca gggcccatag 3900  
 gctgcaactg tgaccccaa ggcagcgtca gcagccagt tgatgctgct ggtcagtgc 3960  
 agtgcaaggc ccaggtagaa ggcctcact gcagccact cgcccccc cacttccacc 4020  
 25 tgagtgccag caaccagac ggctgcctgc cctgctctc tatgggcatc acccagcag 4080  
 gcgccagctc tgctacaca cgccacctga tctccacca ctttgcctt ggggacttcc 4140  
 aaggctttgc cctgggtgaa ccacagcgaa acagccgct gacaggagaa ttcactgtg 4200  
 aaccgtgccc cgagggtgccc cagctctctc ttggcaact tgcccaact ggccatgag 4260  
 ccttctactg cgagctgccc gagacatac agggagacaa ggtggcggc tacggtggga 4320  
 30 agttgcgata caccctctc tacacagcag gccacaggg cagccactc tcggacccc 4380  
 atgtgcagat cacgggcaac aacatcatgc tagtggcct ccagccagc ctgcagggcc 4440  
 cagagaggag gagctacgag atcatgttcc gagaggaatt ctggcggcc cccgatggg 4500  
 agccggccac acgagagcac ctctgatgg cactggccga cctggatgag ctctgatcc 4560  
 gggccacgtt ctctccgtg ccgctgggtg ccagcatcag cgagtcagc ctggaggctg 4620  
 35 cccagccgg gccctcaaac agaccccgcc cctcgaggg ggaggagtgc cgctgcccgc 4680  
 caggctacat cggtctgtcc tgccaggact tgcccccg ctacacgcgc accggagtg 4740  
 ggctctacct cgccactgc gagctatgt aatgcaatgg ccactcagac ctgtgccacc 4800  
 cagagactgg ggctgctc caatgccagc acaacgcgc aggggagttc tgcgagctt 4860  
 gtgcccctg ctactacgga gatgccacag ccgggacgc tgaggactgc cagccctgtg 4920  
 40 cctgccact gaccaacca gagaacatgt tttccgcac ctgtgagagc ctgggagccg 4980  
 gcgggtaccg ctgcacggcc tgcaaaccc gctacactgg ccagtactgt gagcagtgtg 5040  
 gccaggtta cgtgggtaac ccagtggtg aagggggcca gtgcctgcca gagacaaacc 5100  
 aagcccccact ggtggtcgag gtccatctc ctggaagcat agtgcaccaa ggtggctccc 5160  
 actcctgctg gtgtcaggtc agtgggagcc cactccacta cttctattg tccgtgagg 5220  
 45 atggggcgcc tgtgcccagc ggacccagc agcgacatca aggtccgag ctccacttcc 5280  
 ccagcgtcca gccctcgat gctgggtct acatttgac ctgccgtaat ctccaccaat 5340  
 ccaataccag ccgggcagag ctgctggtca ctgaggctcc aagcaagccc atcacagtga 5400  
 ctgtggagga gcagcggagc cagagcgtgc gcccgaggc tgacgtcacc ttcactctga 5460  
 cagccaaaag caagtcccca gcctataccc tgggtgtggac ccgctgac aacgggaaac 5520  
 50 tgcccccag agccatgat ttcaatggca tcctgacct tcgcaacgtc cagctgagt 5580  
 atgcaggcac ctacgtgtgc accggtccca acatgtttgc catggaccag ggcacagcca 5640  
 ctctacatgt gcaggcctc ggacacttgt ccgccccgt ggtctccatc catccgccac 5700  
 agctcacagt gcagcccgcc caactggcgg agttccgtg cagcgccaca gggagcccca 5760  
 cgccaccct cgagtggaca gggggcccc gcggccagct ccctgcgaag gcacaaatcc 5820  
 55 acggcgccat cctgcgcctg ccagctgtc agccacgga tcaggcccag tacttgtg 5880  
 gagcccacag cagcgtggg cagcagggtg ccagggtgt gctccacgt catggggggc 5940  
 gtgggcccag agtccaagt agccagaga ggacccagg ccacgcaggc cggaccgtca 6000  
 ggctgtactg cagggtgca ggcgtgcta gcgccacct cacctggagg aaggaaggg 6060

gcagcctccc accacaggcc cggtcagagc gcacagacat cgcgacactg ctcatcccag 6120  
 ccatcacgac tgctgacgcc ggcttctacc tctgctggc caccagccct gcaggcactg 6180  
 cccaggcccg gatgcaagtg gttgtccttt cagcctcaga tgccagccca ccgggggtca 6240  
 agattgagtc ctcatcgctt tctgtgacag aaggggaaaac actcgacctc aactgtgtgg 6300  
 5 tggcagggtc agcccattgcc caggtcacct ggtacaggcg agggggtagc ctgcctcccc 6360  
 acacccaggt gcacggctcc cgtctgcgcc tccccagggt ctaccagct gattctggag 6420  
 aatatgtgtg ccgtgtggag aatggatcgg gccccaaagg ggctccatt actgtgtctg 6480  
 tgctccacgg caccattctt ggccccagct acacccaggt gccgggcagc acccggccca 6540  
 10 tccgcatcga gccctcctcc tcacacgtgg cgggaaggga gacctggat ctgaactgcg 6600  
 tgggtgcccgg gcaggccccc gcccagggtca cgtggcacaa gcgtggggggc agcctccctg 6660  
 cccggcacca gacccacggc tcgctgtctg ggtgaccca ggtgaccccg gccgactcag 6720  
 gcgagtatgt gtgccatgtg gtgggcacct ccggccccct agaggcctca gtcctgggtca 6780  
 ccatcgaagc ctctgtcatc cctggaccca gccacactgt caggatcgag tcttcatcct 6840  
 ccacagtggc cgagggccag accctggatc tgagctgctt ggtggcaggg caggccacg 6900  
 15 cccagggtcac atggtacaag cgtgggggca gcctccctgc ccggcaccag gttcgtggct 6960  
 cccgcctgta catcttccag gcctcacctg ccgatgcggg acagtacgtc tgccgggcca 7020  
 gcaacggcat ggaggcctcc atcacgggtca cagtaactgg gacccagggg gccaaacttag 7080  
 cctacctgct cggcagcacc cagcccatcc gcatcgagcc ctctcctcg caagtggcgg 7140  
 aagggcagac cctggatctg aactgcgtgg tgccgggca gtcccatgcc caggtcacgt 7200  
 20 ggcacaagcg tgggggcagc ctccctgtcc tgaccagac ccacggctcc ctgtcagac 7260  
 tctaccaagc gtccccgcc gactcgggcg agtacgtgtg ccgagtgtt ggcagctccg 7320  
 tgctctaga ggctctgtc ctggtcacca ttgagcctgc gggctcagtg cctgcacttg 7380  
 gggtcacccc caggttcgg atcgagtcct cgtcttcgca agtggccgag gggcagaccc 7440  
 tggacctgaa ctgcctcgtt gctggtcagg cccatgccca ggtcacgtgg cacaagcgcg 7500  
 25 ggggcagcct cccggcccgg caccaggtgc atggctcgag gctacgctg ctccaggtga 7560  
 cccagctga ttcaggggag tacgtgtgct gtgtggtcgg cagctcaggt acccaggaag 7620  
 cctcagtcct gtccaccatc cagcagcgcc ttagtggctc ccactccag ggtgtggcgt 7680  
 acccgtccg catcgagtcc tctcagcct ccctggcaa tggacacacc ctggacctca 7740  
 actgctggt tgccagccag gctccccaca ccatcacctg gtataagcgt ggaggcagct 7800  
 30 taccagccg gcaccagatc gtgggtccc ggctgcggat ccctcaggtg actccggcag 7860  
 actcgggcca gtacgtgtgt cacgtcagta acggtgcagg ctcccgggag acctcgctca 7920  
 tcgtcaccat ccagggcagc ggttctctcc acgtgccag cgtctccca ccgatcagga 7980  
 tcgagtcgtc ttccccacg gtggtggaag ggcagacctt ggatctgaac tgcgtggctg 8040  
 ccaggcagcc ccaggctatc atcacatggt acaagcgtgg gggcagcctt ccctccgac 8100  
 35 accagaccca tggctccac ctgcggttgc accaaatgtc tgtggctgac tcgggcgagt 8160  
 atgtgtgccg ggccaacaac aacatcgatg ccctggaggc ctccatcgct atctcgtct 8220  
 cccctagcgc cggcagcccc tccgcccctg gcagctccat gccatcaga attgagtcct 8280  
 cctctcaca cgtggccgaa ggggagaccc tggatctgaa ctgctgggtc cccgggcagg 8340  
 cccatgccca ggtcacttg cacaagcgtg ggggcagcct cccagtcac catcagaccc 8400  
 40 gcggctcacg gctgcggctg caccatgtgt ccccgccga ctccgggtgaa tacgtgtgcc 8460  
 ggggtgatgg cagctctggc cccctggagg cctcagtcct ggtcaccatc gaagcctctg 8520  
 gctcaagtgc tgtccacgtc cccgcccag gtggagcccc acccatccgc atcgagcct 8580  
 cctctctccg agtggcagaa gggcagaccc tggatctgaa gtgctgggtg cccgggcagg 8640  
 cccacgcccc ggtcacatgg cacaagcgtg gaggaacct cctgcccgg caccaggtcc 8700  
 45 acggcccaact gctgaggctg aaccaggtgt ccccgctga ctctggcgag tactcgtgcc 8760  
 aagtgaacgg aagctcaggc accctggagg catctgtcct ggtcacaatt gagccctcca 8820  
 gcccaggacc cattcctgct ccaggactgg cccagcccat ctacatcgag gcctcctctt 8880  
 cacacgtgac tgaaggcgag actctggatc tgaactgtgt ggtgcccggg caggcccatg 8940  
 cccaggtcac gtggtacaag cgcgggggca gctccccgc ccggcaccag acccatggct 9000  
 50 cccagctgcg gctccacctc gtctccccg ccgactcagg cgagtatgtg tgtcgtgcag 9060  
 ccagcggccc aggccttgag caagaagcct ccttcacagt caccgtccc cccagtggag 9120  
 ggtcttctta ccgcttagg agcccggtca tctccatcga cccgcccagc agcaccgtgc 9180  
 agcagggcca ggtgccagc ttcaagtgc tcattccatga cggggcagcc cccatcagcc 9240  
 tcgagtggaa gacccggaac caggagctgg aggacaacgt ccacatcagt cccaatggct 9300  
 55 ccatcatcac catcgtgggc acccggccca gcaaccacgg tacctaccgc tgcgtggcct 9360  
 ccaatgccta ccgtgtggcc cagagtgtgg tgaacctcag tgtgcacggg cccctacag 9420  
 tgtccgtgct ccccgagggc cccgtgtggg tgaagtggg aaaggctgtc acctggagt 9480  
 gtgtcagtcg cggggagccc cgtcctctg ctctgtggac ccggatcagc agcaccctg 9540

ccaagttgga gcagcggaca tatgggctca tggacagcca cgcggtgctg cagatttcat 9600  
 cagctaaacc atcagatgcg ggcacttatg tgtgccttgc tcagaatgca ctaggcacag 9660  
 cacagaagca ggtggaggtg atcgtggaca cgggcgccat ggccccaggg gcccctcagg 9720  
 tccaagctga agaagctgag ctgactgtgg aggctggaca cacggccaac ttgcgctgct 9780  
 5 cagccacagg cagccccgcg cccaccatcc actggtccaa gctgcgttcc ccactgccct 9840  
 ggcagcaccg gctggaaggt gacacactca tcataccccg ggtagcccag caggactcgg 9900  
 gccagtacat ctgcaatgcc actagccctg ctgggcacgc tgaggccacc atcatcctgc 9960  
 acgtggagag cccaccatat gccaccacgg tcccagagca cgcttcggtg caggcagggg 10020  
 agacggtgca gctccagtgc ctggctcacg ggacaccccc actcaccttc cagtggagcc 10080  
 10 gcggtgggag cagccttctt gggagggcga ccgccaaggaa cgagctgctg cactttgagc 10140  
 gtgcagcccc tgaggactca ggccgctacc gctgcggggt caccaacaag gtgggctcag 10200  
 ccgaggcctt tgcccagctg ctcgctcaaag gccctccccg ctctctccct gccacctcca 10260  
 tcccagcagg gtccacgccc accgtgcagg tcacgcctca gctagagacc aagagcattg 10320  
 gggccagcgt tgagtccac tgtgctgtgc ccagcgacca gggtagccag ctccgttggg 10380  
 15 tcaaggaagg gggtcagctg cctccgggtc acagcgtgca ggatgggggtg ctccgaatcc 10440  
 agaacttgga ccagagctgc caagggacgt atatatgcca ggccccatgga ccttggggga 10500  
 agggccaggc cagtgcaccag ctggttatcc aagccctgcc ctcggtgctc atcaacatcc 10560  
 ggacctctgt gcagaccgtg gtggttgggc acgcccgtgga gttcgaatgc ctggcactgg 10620  
 gtgaccccaa gcctcagggtg acatggagca aagttggagg gcacctgagg ccaggcattg 10680  
 20 tgcagagcgg aggtgtcgtc aggatgcgcc cagtagagct ggctgatgag ggacagtatc 10740  
 gctgcactgc caccaacgca gctggcacca cacaatccca cgtcctgctg cttgtgcaag 10800  
 ccttgcccca gatctcaatg ccccaagaag tccgtgtgcc tgctgggttct gcagctgtct 10860  
 tccccctgcat agcctcaggc taccctactc ctgacatcag ctggagcaag ctggatggca 10920  
 gcctgccacc tgacagccgc ctggagaaca acatgtgat gctgccctca gtccgacccc 10980  
 25 aggacgcagg tacctacgtc tgcaccgcca ctaaccgcca gggcaagggtc aaagcctttg 11040  
 cccacctgca ggtgccagag cgggtggtgc cctacttcac gcagaccccc tactccttcc 11100  
 taccgctgcc caccatcaag gatgcctaca ggaagttcga gatcaagatc accttccggc 11160  
 ccgactcagc cgatgggatg ctgctgtaca atgggcagaa gcgagtccca gggagcccca 11220  
 ccaacctggc caaccggcag cccgacttca tctccttcgg cctcgtgggg ggaaggcccg 11280  
 30 agttccgggtt cgatgcaggc tcaggcatgg ccaccatccg ccatccaca ccactggccc 11340  
 tggggcattt ccacaccgtg accctgctgc gcagcctcac ccagggtccc ctgattgtgg 11400  
 gtgacctggc cccggtcaat gggacctccc agggcaagtt ccagggcctg gatctgaacg 11460  
 aggaactcta cctgggtggc tatcctgact atggtgccat ccccaaggcg gggctgagca 11520  
 gcggcttcat aggtgtgtc cgggagctgc gcatccaggg cgaggagatc gtcttccatg 11580  
 35 acctcaacct caccggcac ggcactctcc actgccccac ctgtcgggac cggccctgcc 11640  
 agaatggcgg tcagtgccat gactctgaga gcagcagcta cgtgtgcgtc tgcccagctg 11700  
 gcttcaccgg gagccgctgt gagcactcgc aggcctgca ctgccatcca gaggcctgtg 11760  
 ggcccagcgc cacctgtgtg aaccggcctg acggtcgagg ctacacctgc cgctgccacc 11820  
 tgggcccgtc ggggttgctg tgtgaggaag gtgtgacagt gaccaccccc tcgctgtcgg 11880  
 40 gtgctggctc ctacctggca ctgcccggcc tcaccaaacac acaccacgag ctacgctgg 11940  
 acgtggagtt caagccactc gcccctgacg gggctcctgt gttcagcggg gggaaagagcg 12000  
 ggctgtgga ggacttcgtg tccctggcga tgggtggcgg ccacctggag ttccgctatg 12060  
 agttggggtc agggctggcc gttctgcgga gcgccgagcc gctggccctg ggcgctggc 12120  
 accgtgtgtc tgcagagcgt ctcaacaagg acggcagcct gcgggtgaat ggtggacgcc 12180  
 45 ctgtgctgcg ctctcggccc ggcaagagcc agggcctcaa cctgcacacc ctgctctacc 12240  
 tgggggggtg ggagccttcc gtgccactgt ccccgccac caacatgagc gctcacttcc 12300  
 gcggctgtgt gggcgagggtg tcagtgaatg gcaaacgggt ggacctcacc tacagtttcc 12360  
 taggcagcca gggcatcggg caatgctatg atagctcccc atgtgagcgc cagccttgcc 12420  
 50 aacatggtgc cagtgcatg cccgctggcg agtatgagtt ccagtgcctg tgtcgagatg 12480  
 gattcaaaag agacctgtg gagcacggt gactctgctt cctggcttc tctggcccac 12600  
 tgcattgggg cacttgccag ggcacccgct gcctctgctt cctggcttc tctggcccac 12660  
 gctgccaaca aggtctgga catggcatag cagagtccga ctggcatctt gaaggcagcg 12660  
 ggggcaatga tgcccctggg cagtacggag cctatttcca cgatgatggc ttccctcgct 12720  
 tccctggcca tgtcttctcc aggagcctgc ccgaggtgcc cgagaccatc gagctggagg 12780  
 55 ttccggaccag cacagccagt ggcctcctgc tctggcaggg tgtggagggt ggagaggccg 12840  
 gccaaggcaa ggacttcac agcctcgggc ttcaagacgg gcaccttgc ttccaggtacc 12900  
 agctgggtag tgggagggc cgctggtct ctgaggaccc catcaatgac ggcgagtgcc 12960  
 accgggtgac agcactgagg gagggcccga gaggttccat ccaagtgcac ggtgaggagc 13020



```

    tggtcagcgg ccggtcccca ggtcccaacg tggcagtc aa cgccaagggc agcgtctaca 13080
    tcggcgggagc ccctgacgtg gccacgctga ccggggggcag attctcctcg ggcacacag 13140
    gctgtgtcaa gaacctgggtg ctgcactcgg cccgaccg cgccccgccc ccacagcccc 13200
    tggacctgca gcaccgcgcc caggccgggg ccaacacacg cccctgcccc tcgtaggcac 13260
5    ctgcctgccc cacacggact cccggggcac gccccagccc gacaatgtcg agtatattat 13320
    tattaatatt attatgaatt tttgtaagaa accgaggcga tgccacgctt tgcgtctacc 13380
    gccctgggct ggactggagg tgggcatgcc accctcacac acacagctgg gcaaagccac 13440
    aaggctggcc agcaaggcag gttggatggg agtgggcacc tcagaaagtc accaggactt 13500
    ggggtcagga acagtggctg ggtgggcccc gaactgcccc cactgtcccc ctaccaccg 13560
10   atggagcccc cagatagagc tgggtggcct gtttctgcag cccttgggca gttctcactc 13620
    ctaggagagc caacctcggc ttgtgggctg gtgccccaca gctacctgag acgggcatcg 13680
    caggagtctc tgccaccac ctaggattcg gaattgtctt tagtgccggc tgtggagcaa 13740
    aaggcagctc acccctgggc aggcgggtccc catccccacc agctcgtttt tcagcacc 13800
    caccacctc caccagccc ctggcacctc ctctggcaga ctccccctcc taccacgtcc 13860
15   tcctggcctg cattcccacc ccctcctgcc agcacacagc ctgggggtccc tccctcaggg 13920
    gctgtaaggg aaggcccacc ccaactctta ccaggagctg ctacaggcag agcccagcac 13980
    tgatagggcc ccgcccaccg ggccccgccc accccaggcc acatccccac ccatctgga 14040
    gtgaaggccc agggactcct ccaacagaca acggacggac ggatgccgct ggtgctcagg 14100
    aagagctagt gccttaggtg ggggaaggca ggactcacga ctgagagaga gaggaggggg 14160
20   atatgaccac cctgccccat ctgcaggagc ctgaagatcc agctcaagtg ccatcctgcc 14220
    agtggccccc agactgtggg gttgggacgc ctggcctctg tgcctagaa gggaccctcc 14280
    tgtggtcttt gtcttgattt ttcttaataa acggtgctat ccccgcc 14327

25   <210> 58
    <211> 15
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

30   <400> 58
    Ile Pro Thr Gly Glu Pro Cys Pro Glu Pro Leu Arg Thr Tyr Gly
        1             5             10             15

35   <210> 59
    <211> 13
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

40   <400> 59
    Ile Glu Ser Val Leu Ser Ser Ser Gly Lys Arg Leu Gly
        1             5             10

45   <210> 60
    <211> 18
    <212> PRT
50   <213> Homo sapiens

    <400> 60
    Ala Thr Pro Ala Gln Ala His Leu Lys Lys Pro Ser Gln Leu Ser Ser
        1             5             10             15

55   Phe Ser

```

<210> 61  
 <211> 15  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 61  
 Arg Ile Gln Ala Met Ile Pro Lys Gly Ala Leu Arg Val Ala Val  
 10 1 5 10 15  
  
 <210> 62  
 15 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 62  
 20 Gly Ile Cys Gln Cys Leu Ala Glu Arg Tyr Ser Val Ile Leu Leu  
 1 5 10 15  
  
 <210> 63  
 25 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 63  
 30 Glu Lys Met His Glu Gly Asp Glu Gly Pro Gly His His His Lys Pro  
 1 5 10 15  
 Gly  
 35  
  
 <210> 64  
 40 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 64  
 45 Asp Leu Gln Asn Phe Leu Lys Lys Glu Asn Lys Asn Glu  
 1 5 10  
  
 <210> 65  
 50 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 65  
 55 Val Lys Leu Gly His Pro Asp Thr Leu Asn Gln Gly Glu Phe Lys Glu  
 1 5 10 15

Leu Val Arg

5  
 <210> 66  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10  
 <400> 66  
 ttywsntggg ayaaytgytt ygarggnaar gayccngcng tnathmgn 48

15  
 <210> 67  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

20  
 <400> 67  
 taywsnytn cnaarwsnga rttygcngtn ccngayytng arytnccn 48

25  
 <210> 68  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30  
 <400> 68  
 Phe Ser Trp Asp Asn Cys Phe Glu Gly Lys Asp Pro Ala Val Ile Arg  
 1 5 10 15

35  
 <210> 69  
 <211> 585  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

40  
 <400> 69  
 gaygcncng gncartaygg ngentaytty caygaygayg gnttyytngc nttyccnggn 60  
 caygtnttyw snmgnwsnyt nccngargtn ccngaracna thgarytn ga rgtnmgnacn 120  
 wsnacngcnw snggnytnyt nytntggcar ggngtngarg tnggngargc nggncarggn 180  
 aargayttya thwsnytnng nytnccargay ggncayytng tnttymgnta ycarytnggn 240  
 45 wsnngngarg cnmgnytngt nwsngargay ccnathaayg ayggngartg gcaymgngtn 300  
 acngcnytnm gngarggnmg nmngngnwsn mgncargtn ayggngarga rytngtnwsn 360  
 ggnmgwnsnc cnggnccnaa ygtngcngtn aaygcnaarg gnwsngnta yathggnggn 420  
 gcncngayg tngcnacnyt nacngnggn mgnttywsnw snggnathac nggntgygt 480  
 aaraayytng tnytncaysw ngcnmgncn ggngcncnc cncncarcc nytngayyt 540  
 50 carcaymgng cncargcngg ngcnaayacn mgncntgyc cnwsn 585

55  
 <210> 70  
 <211> 597  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 70

atgaartggg tntgggcnyt nytnytnytn gcngcntggg cngcngcnga rmngngaytgy 60  
 mngntnwnsw snttymngnt naargaraay ttygayaarg cnmgnttyws nggnacntgg 120  
 taygcnatgg cnaaraarga yccngarggn ytnttytnc argayaayat hgtngcngar 180  
 ttywsngtng aygaracngg ncaratgwn gcnacngcna arggnmgnt nmngnytnytn 240  
 5 aayaaytggg aygtntgygc ngayatggtn ggnacnttya cngayacnga rgayccngcn 300  
 aarttyaara tgaartaytg gggngtngcn wsnttytnc araarggnaa ygaygaycay 360  
 tggathgtng ayacngayta ygayacntay gcngtncart aywsntgymg nytnytnaay 420  
 ytngayggna cntgygcnga ywsntaywsn ttygtnttyw snmgngaycc naayggnytn 480  
 ccncngarg cncaraarat hgtnmngncar mgncargarg aryntgyt ngcnmgncar 540  
 10 taymgnytna thgtncayaa yggntaytgy gayggnmgw sngarmgnaa yytnytn 597

<210> 71  
 <211> 579  
 15 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 71  
 atgcarwsny tnatgcargc nccnytnytn athgcnytng gnytnytnyt ngcnacnccn 60  
 20 gcncargcnc ayytnaaraa rccnwsncar ytnwsnwsnt tywsntggga yaaytgytty 120  
 garggnaarg ayccngcngt nathmgwnsn ytnacnytnng arcengaycc nathgtngtn 180  
 ccnggnaayg tnacnytnws ngtngtnggn wsnacnwsng tnccnytnws nwsnccnytn 240  
 aargtngayy tngtntnga raargargtn gcnggnytn ggathaarat hccntgyacn 300  
 gaytayathg gnwsntgyac nttygaray ttytgygayg tnytngayat gytnathccn 360  
 25 acnggngarc cntgyccnga rccnytnmgn acntayggny tnccntgyca ytgycntty 420  
 aargarggna cntaywsnyt nccnaarwsn garttygcng tnccngayyt ngarytnccn 480  
 wsntggytna cnacnggnaa ytaymgnath garwsngtny tnwsnwsnws nggnaarmgn 540  
 ytnngntgya thaarathgc ngcnwsnytn aarggnath 579

30  
 <210> 72  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35  
 <400> 72  
 Tyr Ser Leu Pro Lys Ser Glu Phe Ala Val Pro Asp Leu Glu Leu Pro  
 1 5 10 15

40  
 <210> 73  
 <211>  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

45  
 <400> 73

50  
 MQSLMQAPLL IALGILLATP AQAHKKPSQ  
 LSSFSWDNCD EGKDPVIRS LTLEDPVV  
 PGNVTLVVG STSVPLSSPL KVDLVLEKEV  
 AGLWIKIPCT DYIGSCTFEH FCDVLDMLIP  
 TGEPCPEPLR TYGLPCHCPF KEGTYSLPKS  
 EFVVPDLELP SWLTTGNYRI ESVLSSSGKR  
 LGCIKIAASLKG

55

<210> 74  
<211>  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

5

&lt;400&gt; 74

10

|   |
|---|
| GDVCQDCIQM VTDIQTAVRT NSTFVQALVE<br>HVKEECDRLG PGMADICKNY ISQYSEIAIQ<br>MMMHMQDQQP KEICALVGFC DEV |
|---|

15

<210> 75  
<211>  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20

&lt;400&gt; 75

25

MTCKMSQLER NIETIINTFH QYSVKLGHPD  
TLNQGEFKEL VRKDLQNFLK KENKNEKVIE  
HIMEDDLDTN ADKQLSFEEF IMLMARLTWA  
SHEKMHEGDE GPGHHHKPGL GEGTP

30

35

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
25 janvier 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/05422 A3**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
G01N 33/68, 33/564, C07K 14/47, A61K 38/17

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR00/02057

(22) Date de dépôt international : 17 juillet 2000 (17.07.2000)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
99/09372 15 juillet 1999 (15.07.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
**BIOMERIEUX STELHYS** [FR/FR]; Chemin de  
L'Orme, F-69280 Marcy L'Etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **ROECK-  
LIN, Dominique** [FR/FR]; 14 Rue de la Paix, F-67500  
Niederschaeffolsheim (FR). **KOLBE, Hanno** [FR/FR]; 6

Rue des Tuilliers, F-67204 Achenheim (FR). **CHARLES,  
Marie-Hélène** [FR/FR]; 3 Allée de la Lamperte, F-69420  
Condrieu (FR). **MALCUS, Carine** [FR/FR]; 9 Rue des  
Ronzières, F-69530 Brignais (FR). **SANTORO, Lyse**  
[FR/FR]; 47 Avenue Bergeron, F-69260 Charbonnières les  
Bains (FR). **PERRON, Hervé** [FR/FR]; 15 Rue de Boyer,  
F-69005 Lyon (FR).

(74) Mandataire : **DIDIER, Mireille**; Cabinet Germain et  
Maureau, Boîte Postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06  
(FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: USE OF A POLYPEPTIDE FOR DETECTING, PREVENTING OR TREATING A PATHOLOGICAL CONDITION  
ASSOCIATED WITH A DEGENERATIVE, NEUROLOGICAL OR AUTOIMMUNE DISEASE

(54) Titre : UTILISATION D'UN POLYPEPTIQUE POUR DETECTER, PREVENIR OU TRAITER UN ETAT PATHOLOGIQUE  
ASSOCIE A UNE MALADIE DEGENERATIVE, NEUROLOGIQUE AUTOIMMUNE

(57) Abstract: The invention concerns the use of at least one polypeptide comprising a protein fragment to obtain a diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic composition for detecting, preventing or treating a pathological condition associated with a degenerative and/or neurological and/or autoimmune disease, said protein being selected among the proteins whereof the peptide sequence in native state corresponds to SEQ ID No 1, SEQ ID No 2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5, SEQ ID No 6, SEQ ID No 7, SEQ ID No 8, SEQ ID No 9, SEQ ID No 10, SEQ ID No 11, SEQ ID No 12, SEQ ID No 13, SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18, SEQ ID No 19, SEQ ID No 20, SEQ ID No 21, SEQ ID No 22, SEQ ID No 23, SEQ ID No 24, SEQ ID No 25, SEQ ID No 26, SEQ ID No 27, SEQ ID No 28 and SEQ ID No 29, and the peptide sequences having at least 70 % identity, preferably at least 80 % identity and advantageously at least 98 % identity with any one of the peptide sequences SEQ ID No 1 to SEQ ID No 8 and SEQ ID No 10 to SEQ ID No 29, and the peptide sequences or fragments of said sequences belonging to a common family of proteins selected among perlecan, the precursor of the retinol-binding plasmatc protein, of the precursor of the activator of GM2 ganglioside, of calgranulin B and of saposin B.

(57) Abrégé : Utilisation d'au moins un polypeptide comprenant au moins un fragment d'une protéine pour obtenir une composition diagnostique, pronostique, prophylactique ou thérapeutique destinée à détecter, prévenir ou traiter un état pathologique associé à une maladie dégénérative et/ou neurologique et/ou auto-immune, ladite protéine étant choisie parmi les protéines dont la séquence peptidique à l'état natif correspond à SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28 et SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques qui présentent au moins 70 % d'identité, de préférence au moins 80 % d'identité et avantageusement au moins 98 % d'identité avec l'une quelconque des séquences peptidiques SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 8 et SEQ ID N° 10 à SEQ ID N° 29, et les séquences peptidiques ou les fragments desdites séquences appartenant à une même famille de protéines choisies parmi le perlecan, le précurseur de la protéine plasmatique de liaison au rétinol, du précurseur de l'activateur du ganglioside GM2, de la calgranuline B et de la saposine B.

WO 01/05422 A3



MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

**Publiée :**

-- avec rapport de recherche internationale

**(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:**

28 février 2002



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02057

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/68 G01N33/564 C07K14/47 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X          | US 5 876 954 A (DOBRANSKY TOMAS ET AL)<br>2 March 1999 (1999-03-02)<br>column 28; claim 17<br>& EP 0 667 354 A<br>16 August 1995 (1995-08-16)<br>claim 5<br>& WO 95 21859 A<br>cited in the application<br>--- | 1-21, 40,<br>51-62    |
| X          | WO 97 33466 A (BIO MERIEUX ; RIEGER<br>FRANCOIS (FR); PERRON HERVE (FR);<br>BENJELLOUN N)<br>18 September 1997 (1997-09-18)<br>cited in the application<br>claims<br>---<br>-/--                               | 1-21, 40,<br>51-62    |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*8\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 January 2001

Date of mailing of the international search report

08.02.2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoekstra, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02057

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X          | JP 08 308582 A (KAO CORP)<br>26 November 1996 (1996-11-26)<br>the whole document   | 23                    |
| A          | RIEGER F ET AL: "UN FACTEUR GLIOTOXIQUE<br>ET LA SCLEROSE EN PLAQUES GLIOTOXICITY IN<br>MULTIPLE SCLEROSIS"<br>COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE<br>DES SCIENCES. SERIE III: SCIENCES DE LA<br>VIE,NL,ELSEVIER, AMSTERDAM,<br>vol. 319, no. 4,<br>1 April 1996 (1996-04-01), pages 343-350,<br>XP000602023<br>ISSN: 0764-4469<br>abstract | 1-21,40,<br>51-62     |
| A          | KISILEVSKY R ET AL: "ARRESTING<br>AMYLOIDOSIS IN VIVO USING SMALL-MOLECULE<br>ANIONIC SULPHONATES OR SULPHATES:<br>IMPLICATIONS FOR ALZHEIMER'S DISEASE"<br>NATURE MEDICINE,US,NATURE PUBLISHING, CO,<br>vol. 1, no. 2,<br>1 February 1995 (1995-02-01), pages<br>143-148, XP000611547<br>ISSN: 1078-8956<br>the whole document                  | 1-21,40,<br>51-62     |
| A          | WO 90 07712 A (BISSENDORF PEPTIDE GMBH)<br>12 July 1990 (1990-07-12)<br>page 2   | 1-21,40,<br>51-62     |
| A          | WO 98 11439 A (BIO MERIEUX ;PERRON HERVE<br>(FR); MALCUS VOCANSON CARINE (FR); MANDR)<br>19 March 1998 (1998-03-19)<br>the whole document  | 1-21,40,<br>51-62     |
| A          | CA 2 214 843 A (HSC RESEARCH AND<br>DEVELOPMENT LIMITED PARTNERSHIP, CA)<br>30 April 1999 (1999-04-30)<br>the whole document   | 1-63                  |

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See additional sheet

After review as per PCT Rule 40.2(e), no fee is to be refunded.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
  
22-39 (completely); 1-21, 40-63 (partly)
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims: it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**☒  
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority found several (groups of) inventions in the international application, namely:

1. Claims: 1-21, 40, 51-62 (partly)

Perlecan polypeptides involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 1, 2, 69).

2. Claims: 1-21, 40, 51-63 (partly)

Polypeptides precursor of the retinol-binding plasmatic protein involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 4, 5, 6, 7, 30, 70).

3. Claims: 22-39 (completely); 1-21, 40-63 (partly)

Polypeptides precursor of the GM2 ganglioside involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 8-16, 66-68, 72).

4. Claims: 1-21, 40-44, 46-63 (partly)

Polypeptides calgranulin B involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 17-23, 43-52).

5. Claims: 1-21, 40-63 (partly)

Polypeptides saposin B involved in diagnostic, prognostic, prophylactic or therapeutic methods (For example: SEQ ID No. 24-29, 53-55).

6. Claim: 64

Use of lycorin.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02057

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 5876954 A                              | 02-03-1999          | FR 2716198 A               | 18-08-1995          |
|   |                     | AU 701972 B                | 11-02-1999          |
|   |                     | AU 1815295 A               | 29-08-1995          |
|   |                     | CA 2142557 A               | 16-08-1995          |
|   |                     | EP 0667354 A               | 16-08-1995          |
|   |                     | FI 954876 A                | 13-10-1995          |
|   |                     | WO 9521859 A               | 17-08-1995          |
|   |                     | JP 2803910 B               | 24-09-1998          |
|   |                     | JP 8511808 T               | 10-12-1996          |
|   |                     | NO 954081 A                | 13-12-1995          |
|   |                     | NZ 281260 A                | 27-05-1998          |
|   |                     | US 5728540 A               | 17-03-1998          |
| WO 9733466 A                              | 18-09-1997          | FR 2745974 A               | 19-09-1997          |
|   |                     | AU 2165897 A               | 01-10-1997          |
|   |                     | CA 2221028 A               | 18-09-1997          |
|   |                     | EP 0825811 A               | 04-03-1998          |
|   |                     | JP 11512623 T              | 02-11-1999          |
| JP 08308582 A                             | 26-11-1996          | NONE                       |                     |
| WO 9007712 A                              | 12-07-1990          | NONE                       |                     |
| WO 9811439 A                              | 19-03-1998          | EP 0925504 A               | 30-06-1999          |
| CA 2214843 A                              |                     | NONE                       |                     |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N°  
PCT / FR 00 / 02057

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

IPC 7 G01N 33/68 G01N 33/564 C07K 14/47 A61K 38/17

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la (CIB)

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

IPC 7 G01N C07K

Documentation consultée au que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électroniques consultées au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)  
BIOSIS, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS

| Catégorie <sup>o</sup> | Identification des documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | n°. des revendications visées |
|------------------------|--|-------------------------------|
| X                      | US 5 876 954 A (DOBRANSKY TOMAS ET AL)<br>2 mars 1999 (02.03.99)<br>colonne 28; revendication 17<br>& EP 0 667 354 A<br>16 août 1995 ( 16.08.95)<br>revendication 5<br>& WO 95 21859 A<br>cité dans la demande | 1-21, 40,<br>51-62            |
| X                      | WO 97 33466 A (BIO MERIEUX; RIEGER<br>FRANCOIS (FR); PERRON HERVE (FR);<br>BENJELLOUN N )<br>18 septembre 1997 (18.09.97)<br>cité dans la demande<br>revendications  | 1-21, 40,<br>51-62            |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégorie spéciale de documents cités :

"A" document définissant l'état général de la technique, n'étant pas considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour permettre de comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche a été effectivement achevée  
30 janvier 2001 (30.01.01)

Date d'expédition du rapport de recherche  
08 février 2001 (08.02.01)

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen Brevets  
n° de télécopieur

Fonctionnaire autorisé

n° de téléphone

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°  
PCT / FR 00 / 02057

## C. (suite). DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS

| Catégorie° | Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | n° des revendications visées |
|------------|--|------------------------------|
| X          | JP 08 308582 A (KAO CORP)<br>26 novembre 1996 (26.11.96)<br>le document en entier  | 23                           |
| A          | RIEGER F ET AL : "UN FACTEUR GLIOTOXIQUE<br>ET LA SCLEROSE EN PLAQUES GLIOTOXICITY IN<br>MULTIPLE SCLEROSIS"<br>COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE<br>DES SCIENCES. SERIE III: SCIENCE DE LA<br>VIE, NL, ELSEVIER, AMSTERDAM,<br>Vol. 319, no. 4,<br>1 avril 1996 (01.04.96), pages 343-350,<br>XP000602023<br>ISSN: 0764-4469<br>Abrégé | 1-21, 40,<br>51-62           |
| A          | KISILEVSKY R ET AL: "ARRESTING<br>AMYLOIDOSIS IN VIVO USING SMALL-MOLECULE<br>ANIONIC SULPHONATES OR SULPHATES:<br>IMPLICATIONS FOR ALZHEIMER'S DISEASE"<br>NATURE MEDICINE, US, NATURE PUBLISHING, CO,<br>Vol. 1, no. 4,<br>1 février 1995 (01.02.95), pages<br>143-148, XP0611547<br>ISSN: 1078-8956<br>Le document en entier                | 1-21, 40,<br>51-62           |
| A          | WO 90 07712 A (BISSENDORE PEPTIDE GMBH)<br>12 juillet 1990 (12.07.90)<br>page 2  | 1-21, 40,<br>51-62           |
| A          | WO 98 11439 A (BIO MERIEUX ; PERRON HERVE<br>(FR); MALCUS VOCANSON CARINE (FR); MANDOR)<br>19 mars 1998 (19.03.98)<br>Le document en entier  | 1-21, 40,<br>51-62           |
| A          | CA 2 214 843 A (HSC RESEARCH AND<br>DEVELOPMENT LIMITED PARTNERSHIP, CA)<br>30 avril 1999 (30.04.99)<br>Le document en entier  | 1-63                         |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

demande internationale n°  
PCT/FR 00/02057

## **Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé qu certaines revendications n pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

## **Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

Après réexamen selon la Règle 40.2(e) PCT,  
aucune taxe additionnelle n'est à rembourser.

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☒ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup> 22-39 complet, 1-21 and 40-63 en partie
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>

Remarque quant à la réserve

- ☒ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.



## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

## 1. revendications: 1-21,40,51-62 en partie

Polypeptides perlecans être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No 1, 2, 69).

## 2. revendications: 1-21, 40, 51-63 en partie

Polypeptides précurseur de la protéine plasmatique de liaison de rétinol être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No 4, 5, 6, 7, 30, 70).

## 3. revendications: 22-39 complet; 1-21, 40-63 en partie

Polypeptides précurseur de l'activateur du ganglioside GM2 être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No. 8-16, 66-68, 72).

## 4. revendications: 1-21, 40-44, 46-63 en partie

Polypeptides calgranuline B être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No.17-23, 43-52).

## 5. revendications: 1-21, 40-63 en partie

Polypeptides saposine B être impliquées dans les méthodes diagnostiques, pronostique, prophylactiques ou thérapeutiques (Par exemple: SEQ ID No. 24-29, 53-55).

## 6. revendication : 64

Utilisation de la lycorine

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 00/02057

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publicati n | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s)  | Date de<br>publicati n   |
|---|------------------------|--|--|
| US 5876954 A                                    | 02-03-1999             | FR 2716198 A<br>AU 701972 B<br>AU 1815295 A<br>CA 2142557 A<br>EP 0667354 A<br>FI 954876 A<br>WO 9521859 A<br>JP 2803910 B<br>JP 8511808 T<br>NO 954081 A<br>NZ 281260 A<br>US 5728540 A | 18-08-1995<br>11-02-1999<br>29-08-1995<br>16-08-1995<br>16-08-1995<br>13-10-1995<br>17-08-1995<br>24-09-1998<br>10-12-1996<br>13-12-1995<br>27-05-1998<br>17-03-1998 |
| WO 9733466 A                                    | 18-09-1997             | FR 2745974 A<br>AU 2165897 A<br>CA 2221028 A<br>EP 0825811 A<br>JP 11512623 T  | 19-09-1997<br>01-10-1997<br>18-09-1997<br>04-03-1998<br>02-11-1999   |
| JP 08308582 A                                   | 26-11-1996             | NONE   |  |
| WO 9007712 A                                    | 12-07-1990             | NONE   |  |
| WO 9811439 A                                    | 19-03-1998             | EP 0925504 A   | 30-06-1999   |
| CA 2214843 A                                    |                        | NONE   |  |